Aus dem Institut für Anatomie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. E. Wüstenfeld

Die Gewebekultur als Testsystem

(Lichtmikroskopische und autoradiographische Untersuchungen des ^{3}H-Prolin-Einbaus in Mäusehaut-Monolayerzellen unter dem Einfluß von lathyrogenen Substanzen, Fettsäuren, Proteinsynthesehemmstoffen und 6-Aminonicotinamid)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Judith Einhorn geb. Meyer

aus Bremen

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0069

Aus dem Institut für Anatomie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. E. Wüstenfeld

Die Gewebekultur als Testsystem

(Lichtmikroskopische und autoradiographische Untersuchungen des ^{3}H-Prolin-Einbaus in Mäusehaut-Monolayerzellen unter dem Einfluß von lathyrogenen Substanzen, Fettsäuren, Proteinsynthesehemmstoffen und 6-Aminonicotinamid)

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Judith Einhorn geb. Meyer

aus Bremen

Referent: **Professor Dr. med. H.-J. Merker**

Korreferentin: **Professor Dr. med. I. Boll**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. April 1976

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Lathyrogene Substanzen	7
Fettsäuren	9
Proteinsynthesehemmstoffe	10
6-Aminonicotinamid	12
Material und Methode	14
Gewebezüchtung	14
Fixierung und Färbung	15
Autoradiographie	16
Ergebnisse	20
Diskussion	32
Zusammenfassung	44
Literaturverzeichnis	45

EINLEITUNG

Seit der Entwicklung der Zell- und Gewebekultur zu Beginn dieses Jahrhunderts hat sich der überwiegende Teil der Untersucher zunächst vorwiegend mit dem Verhalten der Zellen außerhalb des lebenden Organismus beschäftigt. Neben einer Vielzahl von methodischen Arbeiten wurden vor allem grundlegende Untersuchungen über Wachstums- und Proliferationskinetik sowie über Veränderungen der Differenzierungsvorgänge durchgeführt. Später wurde der Schwerpunkt mehr auf die Funktionen kultivierter Zellen gelegt, z.B. auf die Untersuchung der Synthese und der Sekretion spezifischer Syntheseprodukte (Lit. siehe MERCHANT et al., 1960).

Durch die Entwicklung von chemisch definierten Kulturmedien von EVANS et al. (1956) und EAGLE (1958-59) wurde es dann möglich, die Kultivationsbedingungen zu standardisieren und damit auch die Wirkung von Substanzen auf Säugetierzellen unter reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen.

Die heute in den meisten Gewebezuchtlaboratorien routinemäßig verwendeten Methoden lassen sich prinzipiell in Organ- und Zellkulturen einteilen. Während in der Organkultur Gewebestücke oder ganze Organe kultiviert werden, sind in der Zellkultur die Zellen aus dem Gewebeverband herausgelöst und wachsen einzeln.

Man kann die Zellkultur nach Art des Wachstums in Deckglas-, Suspensions- und Monolayer-Kulturen einteilen. Die Deckglaskultur ist aus verschiedenen Gründen für die Erfassung von Substanzeffekten nicht geeignet (geringe Zellmengen, Einbau in festes Medium, Persistenz eines häufig nekrotischen Zentrums) und soll deshalb hier nicht besprochen werden.

In der Suspensionskultur wachsen die Zellen schwimmend im Medium und werden durch Schütteln oder Rühren in Suspension

gehalten. Es können große Mengen von Zellen angereichert werden, deren Zellzahl durch Auszählen einer Probe im Coulter Counter oder in der Zählkammer leicht festgestellt werden kann.

In der Monolayer-Kultur dagegen wachsen die Zellen, überdeckt von einer Nährlösung, an der Glas- oder Kunststoffoberfläche des Kulturgefäßes. Dabei ist das Verhältnis von Zellzahl, Mediummenge und Größe der Gasphase für die Proliferation entscheidend (vgl. HALLE, 1967-68). Das Wachstum solcher Kulturen ist dadurch ausgezeichnet, daß die Zellen sich durch Vermehrung auf der verfügbaren Fläche bis zur Bildung einer zusammenhängenden Zellschicht ausbreiten und so nach Fixierung und Färbung im Lichtmikroskop oder im Phasenkontrast besonders gut zu untersuchen sind. Wie Versuche von GREEN und GOLDBERG (1963 u. 1965) mit Fibroblasten zeigten, erfolgt nach Anheftung der Zellen an der Glasoberfläche zunächst eine rasche exponentielle Wachstumsphase, bis die Kultur eine "Sättigungsdichte" erreicht hat, das heißt, bis die Zellen sich gegenseitig berühren. Ein mehrschichtiges Wachstum wird durch die sogenannte "Kontaktinhibition" verhindert (ABERCROMBIE und HEAYSMAN, 1954; STOKER und RUBIN, 1967), bei der es zu einer Hemmung der Mitoserate und des Wachstums kommt. In dieser "stationären" Phase kommt es dann bei vielen Zellarten zur Synthese spezifischer Zellprodukte. Dieser Umschlag von Proliferation zur "Differenzierung" wurde vor allem in Fibroblastenkulturen untersucht. Während in der Wachstumsperiode nur eine geringe konstante Kollagenproduktion zu finden war, stieg diese, nachdem die Zellzahl ihr Maximum erreicht hatte, linear mit der Zeit an. Kollagen wurde also erst nach der logarithmischen Wachstumsphase in größeren Mengen gefunden, als die Zellen sich in der stationären Differenzierungsphase befanden. Auch ABBOTT und HOLTZER (1966) berichteten von einem Antagonismus zwischen Wachstum und Differenzierung, wobei unter Wachstum Vermehrung der Zellzahl und Zunahme der Mitosen verstanden wird und unter Differen-

zierung die Ausbildung zellspezifischer Strukturen und Funktionen. Diese Ergebnisse konnten von weiteren Autoren bestätigt werden (vgl. MURRAY, 1959).
Im Gegensatz dazu fanden DAVIES und Mitarbeiter (1968), daß die Kollagensynthese von Fibroblasten während der S-Phase nicht unterbrochen wird; HINRICHSEN und DENFFER(1970) stellten an Pankreaszellen fest, daß Insulin enthaltende ß-Zellen auch ^{3}H-Thymidin aufnehmen und somit Zellteilungsfähigkeit und Differenzierung nebeneinander bestehen können.

Spezifische Differenzierungsleistungen wurden auch an anderen Zellen in der stationären Phase beobachtet, so die Bildung von Myofilamenten bei Muskelzellen (STOCKDALE und HOLTZER, 1961; SCHULZE und Mitarbeiter, 1966; BISCHOFF und HOLTZER, 1969), die Produktion von Kollagen (SMITH and JACKSON, 1956; GOLDBERG et al., 1963; GOLDBERG and GREEN, 1964), von Hypophysenvorderlappenhormon (THOMPSON et al., 1959), Histamin und Serotonin (SCHINDLER et al., 1959), sauren Mukopolysacchariden (MORRIS and GODMAN, 1960) oder von Hyaluronsäure (HAMERMAN et al., 1965).

Eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Untersuchungsmethoden führte dazu, daß die Zellkulturen zunehmend für die Untersuchung von Substanzwirkungen Verwendung fanden. Durch die Möglichkeit von direkter Beobachtung und Versuchen an lebenden Zellen konnten viele der in vivo komplizierenden Faktoren ausgeschaltet werden, wie z.B. Probleme der Resorption, des Stoffwechsels und der Entgiftung, der Ausscheidung sowie der Speziesunterschiede (POMERAT and LEAKE, 1954; DIAMOND and KOPROWSKI, 1965). Die Tierversuche konnten reduziert werden, die Technik ist relativ billig, der Substanzverbrauch geringer, die Substanzen können direkt zugegeben werden, und für alle Zellen kann eine gleiche Wirkkonzentration erreicht werden. Die Zellen sind zudem der Auswertung leicht zugängig.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß Zellinien kommerziell

in Zentralinstituten zu erwerben sind und somit weitreichende vergleichende Untersuchungen mit identischem Material ermöglichen. Eine kontrollierte Umgebung der Zellen durch chemisch definierte Medien, die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen durch genaue Angabe von Konzentration, Zelltyp, Stamm und Herkunft, Dauer, Temperatureinwirkung, pH-Wert, Frequenz und Methode der Fütterung erlauben weiterhin einen Vergleich mit früheren oder späteren Arbeiten.

Allerdings wurden auch die Grenzen der Verwendbarkeit der Zellkultur als Testsystem sichtbar für Substanzen, die in vivo erst zu ihrer aktiven Wirksubstanz metabolisiert werden, wie etwa das Cyclophosphamid (FOLEY et al., 1960; BROCK and HOHORST, 1967) oder 6-Azauracil (SCHINDLER and WELCH, 1957). Diese Substanzen sind in vitro nicht wirksam, während sie in vivo ihre bekannte Antitumoreigenschaft aufweisen.

Es ist weiterhin zu berücksichtigen, daß Zellen in der Zellkultur verschiedene ihrer spezifischen Funktionen verlieren, bereits durch Dissoziierung des Organs mit Trypsin. Beobachtet wurden Veränderungen der spezifischen Aktivitäten einiger Enzyme in Herzmuskelzellen (HARARY et al., 1964) und in Milchdrüsenzellen (EBNER et al., 1961). Dabei verringern die meisten Enzyme ihre Aktivität, die Zellen nehmen das einheitliche, offenbar einfachere Enzymmuster von entdifferenzierten Zellen an. Man spricht von Dedifferenzierung, wenn spezifische Strukturen oder Syntheseleistungen verloren gehen (STOCKDALE et al., 1963; ABBOTT and HOLTZER, 1966). Dies geschieht häufig in dem Maße, in dem die Zellen proliferieren (WAYMOUTH, 1952; YOUNG, 1962). Jedoch sollte bei Verlust spezifischer Merkmale nicht in jedem Falle von einer allgemeinen Entdifferenzierung gesprochen werden, sondern auf die untersuchte Funktion im Augenblick des Experiments bezogen werden, da gleichzeitig eine Zunahme anderer spezifischer Funktionen als Ausdruck einer Differenzierung bestehen kann (HARARY et al., 1964).

Werden Zellen über längere Zeit kultiviert, können sie mehr oder weniger plötzlich ihre Enzymaktivitäten ändern (WANG et al., 1970), wie auch ihren Nährstoffbedarf (SWIM and PARKER, 1958), ihren DNS-Gehalt (KRYGIER and SANDRITTER, 1961; SCHWARZACHER, 1965) oder ihre Sensibilität gegenüber Zytostatika (DE MARS and HELD, 1972).

Trotz dieser Veränderungen, die bei Zellen in der Kultur auftreten können, führen Arbeiten, die über eine Analogie zwischen Zelleigenschaften von in vitro und in vivo gewachsenen Zellen berichten, zu der Bestätigung, daß sich die Zellkultur gut als Testsystem für Untersuchungen zum Basisstoffwechsel, aber auch zur Aufklärung von Wirkungsmechanismen eignet.

Ein großes Interesse haben in den letzten Jahren Versuche mit Zellkulturen zur orientierenden Testung von Substanzen zur Aufstellung von Dosis-Wirkungsbeziehungen erlangt. Sie wurden besonders intensiv in der Krebsforschung eingesetzt, wie in Untersuchungen mit fluorierten Nukleinbasen (CHEONG et al., 1966), 5-Bromdesoxyuridin (KIM et al., 1967; TOLIVER et al., 1968) und 6-Mercaptopurin (SALSER and BALIS, 1965). PERLMAN und Mitarbeiter (1959) untersuchten die Toxizität antibiotisch wirksamer Substanzen auf L-Zellen. DAWSON und DRYDEN (1967) beschrieben die Anwendung der Gewebekultur für die Testung von Antitumor- und antimikrobiologischen Substanzen, Hormonen, Alkaloiden, Antiphlogistika und Transmittersubstanzen.

Zur Erfassung von Substanzwirkungen auf Zellen in der Kultur wurden viele Methoden entwickelt. Die Bestimmung des Anteils an abgestorbenen Zellen ist z.B. mit der Vitalfärbung möglich (PHILLIPS and ANDREWS, 1959). Direkt im Mikroskop können Präparate im hängenden Tropfen beobachtet werden, entweder um Verlangsamung oder Stillstand des Wachstums, oder Veränderungen innerhalb der Zelle selbst zu sehen. Im Phasenkontrastmikroskop läßt sich lebendes, ungefärbtes Material be-

trachten, häufig verbunden mit Verwendung von Zeitrafferfilmen, um ein Bild von der kontinuierlichen Entwicklung des Experiments zu erhalten. Das Elektronenmikroskop gibt Aufschluß über Mikrostrukturveränderungen (vgl. DAWSON and DRYDEN, 1967).

Andere Autoren verwenden als Parameter die Gesamtzellzahl, Zahl der lebenden und toten Zellen, die Kernzahl, die in Zählkammern oder in elektronischen Zählern bestimmt werden (CUNNINGHAM and KIRK, 1942; PAUL, 1965), die Kerngröße oder Zellgröße, die z.B. durch Auszählen von Gitterpunkten eines aufgelegten Rasters gemessen werden (WEISSENFELS, 1967), weiterhin das totale Zellvolumen oder das Trockengewicht. Durch Messung des Glucoseverbrauchs, des Protein- oder Nukleinsäureumsatzes kann auf Funktionszustände der Zellen geschlossen werden (DANES et al., 1963).

In der Monolayer-Kultur bieten sich zur Bestimmung des Wachstums der Zellen unter dem Einfluß von Substanzen als Parameter die Zelldichte, der mitotische Koeffizient sowie die Zahl der abgekugelten und vakuolisierten Zellen an. Die Zellfunktionen können durch die Anwendung von gezielten Markierungsversuchen erfaßt werden, wie beispielsweise mit ^{3}H-Thymidin, dem charakteristischen Nukleosid der DNS, ^{3}H-Uridin zur Messung des RNS-Umsatzes oder ^{3}H-Leucin zur Bestimmung der Proteinsynthese.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Testung von Pharmakawirkungen auf bestimmte Zellfunktionen in der Zellkultur liefern. Fibroblasten eignen sich hierfür besonders gut, da sie in der stationären Phase als spezifisches Protein das biochemisch und elektronenmikroskopisch leicht quantifizierbare Kollagen produzieren (SCHWARZ et al., 1963; GOLDBERG and GREEN, 1964).

Zur Bestimmung der Kollagensyntheserate wurde die radioaktiv

markierte Aminosäure ^{3}H-Prolin verwendet, weil sie und ihr hydro xyliertes Derivat Hydroxyprolin in relativ hohen Konzentrationen in diesem Protein enthalten sind (Prolin 15, Hydroxyprolin 14 g/100 g Protein, RAPOPORT, 1969). Obwohl Prolin kein spezifischer Kollagenvorläufer ist, finden sich weder im Knorpel noch im Knochen noch im Bindegewebe andere Proteine mit hohem Prolingehalt, so daß angenommen werden kann, daß die zugefügte Menge ^{3}H-Prolin fast ausschließlich in Strukturproteine (Kollagen) eingebaut wird (ROHR, 1966). Die Aminosäure Prolin wird als solche in das Peptid eingebaut. Es entsteht ein Molekül, welches zwar keine makromolekulare Dimension besitzt, aber beide Arten von Prolin enthält: eines, welches für die Hydroxylierung bekannt ist, und ein anderes, welches als Prolin selbst eingebaut wird (HAUSMANN and NEUMAN, 1961). Erst nach der Kettenbildung kommt es durch das Enzym Prolinhydroxylase zur Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin (ROJKIND, 1973; PRIEST, 1973).

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung von Substanzen sowohl auf das Zellwachstum als auch auf die spezifische Zellfunktion. Während die Auswirkung auf das Zellwachstum durch die lichtmikroskopische Auswertung nach bekannten Methoden erfolgt, wird versucht, die spezifische Zellfunktion, die Produktion von Kollagen, durch die Bestimmung des ^{3}H-Prolineinbaus quantitativ in Fibroblasten-Monolayer-Kulturen zu erfassen.

Folgende Substanzen wurden in ihrer Wirkung auf das Zellwachstum und auf die Kollagensynthese geprüft:

Lathyrogene Substanzen

Hierunter werden Substanzen verstanden, die bei chronischer Gabe am Tier Bindegewebsschäden in Form des Lathyrismus hervorrufen. Als Vertreter dieser Gruppe testeten wir D-Penicillamin und ß-Aminopropionitrilfumarat.

D-Penicillamin wurde 1943 von ABRAHAM und Mitarbeitern im Zuge der Konstitutionsaufklärung des Penicillins als ein allen Penicillinen gemeinsames Spaltprodukt gefunden, das sie seines zunächst auffälligen basischen Charakters wegen "Penicillamin" nannten. Sie erkannten bald darauf, daß es sich hierbei um eine bisher unbekannte a-Aminosäure der unnatürlichen D-Reihe, nämlich um D-Dimethylcystein handelte. 1957 wurde die Eigenschaft des D-Penicillamins entdeckt, pathologische Makroglobuline durch Sprengung der intermolekularen Disulfidbrücken, über die die einzelnen Proteinmoleküle miteinander vernetzt sind, zu depolymerisieren (DEUTSCH and MORTON, 1957). Die Wirkung des D-Penicillamins auf das Bindegewebe, die vor allem in einem Aufbrechen der Strukturproteine und des Elastins besteht und dosisabhängig ist (NIMNI and BAVETTA, 1965) und dadurch unlösliches Kollagen in lösliches überführt (ZIMMERMANN and BALDA, 1972), führte zur klinischen Anwendung des D-Penicillamins in der Behandlung von verschiedenen Erkrankungen wie z.B. des Morbus Wilson (WALSHE, 1956; LANGE, 1967), rheumatischen Erkrankungen (DRESNER und TROMBLY, 1960; WASKÖNIG und MEYER, 1973), Kollagenosen (UITTO et al., 1970; DARÓCZY und GYÖNGYVÉR, 1973), der chronisch aggressiven Hepatitis (ALEXANDER, 1971; GROS et al., 1972) sowie von Lungenfibrosen (GROSS, 1972).

ß-Aminopropionitril fumarat (BAPN) ist die aktive Wirksubstanz der Lathyruspflanze. Durch den Genuß der Samen über eine längere Zeit entsteht ein Krankheitsbild mit Symptomen wie Ödemen, Wachstumsstillstand, Skelettdeformationen sowie Hämorrhagien (STIVERS et al., 1971).

Das Syndrom des experimentellen Lathyrismus wurde u.a. an Feten von Ratten erzeugt, die während der Schwangerschaft mit BAPN gefüttert wurden. Die Feten wurden mit Gaumenspalten geboren, abhängig vom Zeitpunkt der BAPN-Gabe (PRATT and KING, 1972). Auch pathologische Veränderungen wie Aortenaneurysmen, Hernien und Knochenverformungen wurden beschrie-

ben (PONSETI, 1954). COULSON und Mitarbeiter (1969) berichten von schweren Knochendeformationen bei Schweinen, HALL (1972) von einer Hemmung der Knorpelbildung in Hühnerembryonen.

In der Gewebekultur führt BAPN zu einer Veränderung der Löslichkeitseigenschaften von Knochenkollagen, allerdings nur in der Kollagenfraktion, die während der Einwirkung von BAPN neu gebildet worden ist (GOLUB et al., 1968). Als Ursache für diese Wirkung wurde eine Störung der Vernetzung der Kollagenmoleküle gefunden durch Hemmung des Enzyms Lysyloxidase, welches den ersten Schritt der Quervernetzung durchführt (PAGE and BENDITT, 1972; NARAYANAN et al., 1972; HANEY et al., 1973). Diese Wirkung konnte klinisch zur Verhinderung von überschüssiger Narbenbildung genutzt werden, wie sie häufig nach Sehnenverletzungen auftritt (BORA et al., 1972).

Fettsäuren

Bei den Fettsäuren werden essentielle und nicht essentielle unterschieden. Der Mangel an essentiellen Fettsäuren führt bei verschiedenen Tierspezies zu schweren Schäden. Bei Ratten tritt nach einiger Zeit ein Wachstumsstillstand ein, es kommt zu Hautschuppung, Schwanznekrose, Nierenschädigung und frühzeitigem Tod (BURR and BURR, 1929). Histologisch werden Veränderungen der Ovarien, des Uterus und anderer Gewebe festgestellt (BURR, 1942). Durch Zusatz der später als essentiell bezeichneten Fettsäuren (HOLMAN, 1958) können diese Tiere geheilt werden (GREENBERG et al., 1950; DEUEL et al., 1951).

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigte sich mit den nicht essentiellen freien Fettsäuren. WEINHOUSE und Mitarbeiter (1950) fanden bereits bei Konzentrationen von 0,25 mÄqu/l eine toxische Wirkung auf eine Reihe von Zellen tierischer

Herkunft. Eine Wachstumshemmung wurde bei Hausfliegenlarven (QURAISHI and THORSTEINSON, 1965), Grillen (FARLANE and HENNEBERRY, 1965) sowie bei Mikroorganismen wie Escherichia coli (STILLWELL et al., 1959), Streptococcus lactis (MAXCY and DILL, 1967) und Corynebacterium acnes (PUHVEL and REISNER, 1970) gefunden.

Als Einfluß auf spezielle Stoffwechselmechanismen zeigten sich eine Hemmung von Aufnahme und Abbau der Glucose im Herzmuskel (HIRCHE and KOIKE, 1964) und eine Hemmung der Insulinwirkung (DELORME, 1965) bei Hunden. LEA und WEBER (1968) beschrieben die Hemmung einer Reihe glycolytischer Enzyme in vitro.

In dieser Arbeit wird die Wirkung von Laurin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure untersucht.

Proteinsynthesehemmstoffe

Puromycin wird von Streptomyces albo niger synthetisiert. Es ist als sehr starker Hemmstoff der Proteinsynthese bekannt, da es relativ spät in den Syntheseweg eingreift (BROTHERTON, 1969 a). Infolge seiner Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-Ende der t-RNS lagert es sich mit einer NH_2-Gruppe an das Carboxylende entstehender Polypeptidketten, so daß diese sich von den Polysomen, an denen die Proteinsynthese stattfindet (KRETSINGER et al., 1964), ablösen (SCHWEIGER, 1964; HAWTREY and BIEDRON, 1966). Die Entstehung inkompletter Polypeptide führt zu einer Hemmung der Proteinsynthese (NATHANS, 1964; SPEIRS, 1965). TAMOKI und MUELLER (1965) untersuchten die Bildung der ribosomalen RNS in Hela-Zellen und fanden eine Hemmung des Zerfalls von 45-S RNS in 28 und 16-S RNS. Neben der Wirkung auf die RNS wurde auch eine Hemmung der DNS-Synthese in sich teilenden Zellen gefunden (BROTHERTON, 1969 b). Ein weiterer Effekt besteht in der Hemmung der nach Prednison regelmäßig auftretenden Erhöhung

der alkalischen Phosphataseaktivität (GRIFFIN and COX, 1966). Auch die Corticoidsynthese als Sekretionsantwort auf ACTH-Gabe wird gehemmt (ANDREWS, 1969). Die Wirkung des Puromycin auf die Kollagensynthese in vitro führt zu einem verminderten ^{3}H-Prolineinbau.

Urbason (6-Methylprednisolon) gehört zu den Glucocorticoiden. Über die Wirkung existiert eine unübersehbare Fülle von Publikationen. Hier können nur einige Arbeiten kurz erwähnt werden, die eine Beziehung zur in vitro-Wirkung aufweisen. Frühere Untersuchungen über die Wirkung von Corticosteroiden auf das Wachstum von Epidermiszellen in vitro zeigen unterschiedliche Reaktionen von Embryo- und Erwachsenenhaut. Hühnerembryohaut zeigt in der Organkultur eine beschleunigte Differenzierung unter dem Einfluß von Hydrocortison (FELL, 1962), während Cortisonacetat zu einer Verlängerung des Überlebens von Erwachsenenhaut in vitro führt (GILETTE et al., 1965). Auch in vivo wurde eine Verzögerung des Wachstums von Epidermiszellen festgestellt. Intraepidermale Injektion von Hydrocortison bei der erwachsenen Maus führt zu einer Reduktion der Zellmitosen (DAVIS, 1964), subcutane Injektionen von Cortisonacetat in männliche Ratten verursachen einen verringerten ^{35}S-Sulfateinbau in den Epiphysenknorpel und die Haut. Die Haut ist sehr dünn und enthält unterentwickelte Follikel und Drüsen (ANASTASSIADES and DZIEWIATKOWSKI, 1970). Die Mucopolysaccharidsynthese ist herabgesetzt.

In Organkulturen sind analoge Effekte zu beobachten. So verursacht Hydrocortison eine Verminderung der Zellmigration in der menschlichen Epidermis und gleichzeitig eine Hemmung der ^{3}H-Thymidinaufnahme in den Basalzellen und damit der DNS-Synthese (CARON, 1969).

Cortisonacetat und Prednisolonsuccinat führten in Fibroblasten-Mischkulturen in hohen Konzentrationen zu einer Wachstumshemmung, in sehr niedrigen Konzentrationen zu einer Wachs-

tumsbeschleunigung (ROHDE et al., 1961), während WIESER und TAIFOUR (1969) auch in niedrigsten Konzentrationen von Prednisolon und Betametason eine Wachstumshemmung in der Fibroblastenkultur fanden.

Unter dem Hydrocortisoneinfluß kommt es in der Schweinehautkultur nach 24 Stunden zu einem erhöhten, nach 72 Stunden zu einem verringerten C^{14}-Arginineinbau in die Zellen (BROTHERTON, 1969 b). In der Primärkultur von Knochenzellen wird der Einbau von Prolin in Kollagen und andere Proteine gehemmt, bei gleichzeitiger Akkumulation von freiem Prolin im Gewebe. Außerdem ist eine Hemmung der Uridinaufnahme und seines Einbaus in RNS zu beobachten (PECK et al., 1967).

6-Aminonicotinamid

6-Aminonicotinamid (6-AN) ist als Stoffwechselgift bekannt. Es wird in verschiedenen Zellen von Rattenorganen von der endoplasmatischen Glucohydrolase zu 6-Aminonicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (6-ANADP) umgebaut, welches ein starker Hemmstoff für NADP-abhängige Dehydrogenasen ist (HERKEN, 1966). In vivo ist die 6-Phospho-gluconat-dehydrogenase das empfindlichste Enzym. Seine Hemmung führt zu einer starken Akkumulation von 6-Phosphogluconat (HERKEN and LANGE, 1969), welches sowohl in vivo als auch in vitro hemmend auf die Glucosephosphat-isomerase wirkt (LANGE et al., 1970). Die dadurch auftretende Blockade des Pentosephosphatcyclus bewirkt eine Verminderung der spezifischen Aktivität der nuklearen RNS (HERKEN et al., 1969).

Neben diesen Stoffwechseleffekten wurden teratologische Veränderungen an verschiedenen Organen gefunden. Die Fütterung von schwangeren Ratten mit 6-AN führt zu Mißbildungen des Skeletts, des ZNS, der Augen, des harnableitenden Systems, der Schilddrüse und des Thymus (CHAMBERLAIN and NELSON, 1963). Injektion von 6-AN in Hühnerembryos rief ebenfalls Mißbildun-

gen des Skeletts hervor, besonders Mikromelie und Papageienschnabel (LANDAUER, 1965). In vitro- und in vivo-Untersuchungen an Rattenembryos zeigen in beiden Fällen eine Störung des Wachstums sowie Mißbildungen, abhängig von der zugefügten Konzentration (TURBOW and CHAMBERLAIN, 1968).

Weiterhin wird über eine Störung der Zahnentwicklung berichtet (MERKER und NOVAK, 1970). Im Elektronenmikroskop zeigen sich nur an Zellen ektodermaler Herkunft pathologische Veränderungen wie an Epidermis, Gehirn, Linse, Retina und Zahnleiste (MERKER et al., 1970). Rattenembryos entwickeln einen kongenitalen Hydrocephalus sowie Defekte im ZNS (CHAMBERLAIN, 1970). Die intraperitoneale Applikation führt zu einer selektiven Schädigung der Neurogliazellen in der grauen Substanz des Rückenmarks sowie des unteren Hirnstammes (SCHNEIDER and CERVOS-NAVARRO, 1974).

MATERIAL UND METHODE

Für diese Versuche wurden Monolayer-Zellen embryonaler Mäusehaut wie folgt kultiviert:

Die sechzehn Tage alten Mäuseembryonen wurden unter sterilen Bedingungen aus dem Uterus der dekapitierten Muttertiere seziert und für die Zellkultur jeweils Stückchen Bauch- und Rückenhaut herausgeschnitten.

Gewebezüchtung

Die Hautstückchen wurden in ca. 1 mm^2 große Fragmente zerkleinert, die dann mit 0,2 % Trypsin in CMF (WIEPJES and PROP, 1970) für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad in Einzelzellen dissoziiert wurden. Nach Gewinnung des Zellsediments erfolgte die Resuspendierung im Wachstumsmedium MEM (Minimal Essential Medium von EAGLE, 1959) unter Zusatz von 10 % inaktiviertem Kälberserum. Die Zellen wurden in Vierkantflaschen eingebracht, die mit 12 ml Wachstumsmedium beschickt worden waren. Die Zelleinsaat betrug 4 x 10^5 Zellen/ml. Die Kultivation erfolgte bei 37°C mit Mediumwechsel (= Fütterung) je nach Zellwachstum nach 2 bis 4 Tagen. 4 Tage nach der ersten Anzucht wurden die Zellen trypsiniert (0,2 % Trypsin in CMF) und jeweils nach 4 bis 8 Tagen umgesetzt. Während der Passagen 2 bis 8 wurden die Zellen für die hier beschriebenen Versuche verwendet.

Für die Prüfung der Wirkung der verschiedenen Substanzen erfolgte die Kultivation anschließend in 6 cm-Nunclon-Schalen (Mecron) mit eingelegtem Deckglas. Je Schale wurden 5 ml Zellsuspension (2 x 10^5 Zellen/ml) eingesetzt. Nach einer Vorinkubation von 2 Tagen erfolgte Mediumwechsel mit Zugabe der entsprechenden Substanzen in den Konzentrationen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind.

Tabelle 1 Substanzen im Zellkulturmedium mit Angabe der verwendeten Substanzen

Substanzen	Dosierungen (µg/ml)		
Lathyrogene Substanzen			
D-Penicillamin	1,0	10	100
BAPN	1,0	10	100
Fettsäuren			
Laurinsäure	100	300	
Palmitinsäure	100	300	
Stearinsäure	30	100	300
Ölsäure	30	100	300
Proteinsynthesehemmstoffe			
Puromycin	0,01	0,1	1,0
Urbason	1,0	10	
Stoffwechselgift			
6 - AN	3,0	10	30

Fixierung und Färbung

Die bewachsenen Deckgläser wurden 48 Stunden nach Zusatz der Prüfsubstanzen in 10 % Formalin fixiert. Die Kulturen, die lichtmikroskopisch beobachtet werden sollten, wurden mit Giemsa gefärbt und nach Alkoholentwässerung sowie Xylolbehandlung in Eukitt eingedeckt. Die morphologische Beurteilung erfolgte durch Auszählen von je 2000 Zellen pro Präparat. Als Parameter galten 1. die Zelldichte als durchschnittliche Zell-

zahl pro Sehfeld, 2. die Zahl der Mitosen pro 2000 Zellen, 3. die Zahl der abgekugelten Zellen als Ausdruck einer Zellschädigung bzw. des Zelltodes.

Autoradiographie

Die zur autoradiographischen Messung bestimmten Kulturen wurden nach der dipping-methode mit Ilford-K5-Emulsion beschichtet und anschließend 5 Stunden bei 18°C getrocknet. Nach 5-tägiger Exposition bei 4°C wurden die Autoradiogramme mit Amidol (1,125 g Amidol; 4,5 g Na_2S wasserfrei; 250 ml aqua bidest. und 2 ml 10 % KBr-Lösung) 20 Minuten lang bei 4°C entwickelt, danach 20 Minuten lang in Natriumthiosulfat fixiert. Die anschließende Färbung erfolgte nach 30 Minuten Wässerung mit Hämalaun.

Für die autoradiographische Bestimmung des ^{3}H-Prolineinbaus unter dem Einfluß der Prüfsubstanzen wurde dem Wachstumsmedium in einer zweiten, parallel angesetzten Versuchsreihe zusätzlich 0,5 µc ^{3}H-Prolin/ml zugegeben (Radiochemical Centre Amersham, 740 mCi/mM).

Auswertung der Autoradiographien

Zur quantitativen Auswertung der Autoradiographien wurde die Anzahl der Silberkörner an Hand von Fotographien der Präparate mit einem elektronischen Bildanalysegerät bestimmt.

Durch die radioaktive Beta-Strahlung des Tritiums im ^{3}H-Prolin wird das Silberbromid in der Fotoschicht zu metallischem Silber reduziert. Die Anzahl der Silberkörner entspricht dem Ausmaß der radioaktiven Strahlung und damit der Menge des eingebauten ^{3}H-Prolins. Zur Zählung der Silberkörner mußten die Präparate fotographiert werden, da eine mikroskopische Eingabeeinheit nicht zur Verfügung stand. Von jedem Präparat wurden 18 zufällig über das Präparat verteilte Aufnahmen (Objek-

tivvergrößerung 100-fach, Ölimmersion) angefertigt; die Endvergrößerung betrug 1250 : 1.

Die Bestimmung der Partikelzahl wurde mit dem automatischen Bildanalysegerät QUANTIMET 720 der Firma Imanco (Metals Research Ltd.) durchgeführt. Beim QUANTIMET wird das fotographische Bild mit einem 720 Vidikon-Bildwandler auf ein Sichtgerät mit insgesamt 650 000 Bildpunkten übertragen. Es können Partikelzahl, Partikelumfang und Partikelfläche gemessen werden, die Angabe für Partikelumfang und -fläche erfolgt in Bildpunkten. Mit Hilfe von Diskriminatoren können die Partikel, die gemessen werden sollen, aufgrund ihres Grautones selektiert und zur Messung zugelassen werden. Für die Zählung der schwarzen Silberkörner genügt es, den Schwellwert (treshold) so einzustellen, daß die Silberkörner gerade erfaßt werden, die Untergrundstrukturen - wie beispielsweise die mit Hämalaun gefärbten Zellstrukturen - jedoch nicht mehr registriert werden.

Es stellte sich jedoch das Problem, daß dicht nebeneinander liegende Silberkörner nicht mehr getrennt werden konnten, wenn der Schwellwert unter einen bestimmten Wert eingestellt werden mußte, was nötig war, wenn nicht ganz scharf und daher nur dunkelgrau abgebildete Silberkörner erfaßt werden sollten. Diese Unschärfe einiger Silberkörner liegt an der relativ großen Tiefenausdehnung der Monolayerzellen, da bei der hohen Vergrößerung die Schärfentiefe des Mikroskops nur gering ist. Da außerdem durch den fotographischen Prozeß Unterschiede im Untergrundgrau bei verschiedenen Aufnahmen auftraten, mußte die Messung standardisiert werden.

Dazu wurden an 100 einzeln liegenden Silberkörnern verschiedener Präparate die Umfänge der Silberkörner bestimmt. Es konnte ein durchschnittlicher Umfang von 15,7 Bildpunkten pro Silberkorn mit einer Standardabweichung von 2,75 Bildpunkten ermittelt werden.

Nun wurden an einem Kontrollpräparat Silberkornzahl und Gesamtumfang aller Silberkörner bei verschiedenen Schwellwerteinstellungen bestimmt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 2. Der mittlere Umfang von 15,7 Bildpunkten pro Silberkorn wird bei einer Schwellwerteinstellung von 85/86 Skalenteilen wiedergegeben. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung wurden die Messungen also innerhalb der Schwellwerteinstellung von 82 bis 88 Skalenteilen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde bei jeder Messung der durchschnittliche Umfang pro Silberkorn errechnet. Es zeigte sich dabei, daß bei allen Präparaten der durchschnittliche Umfang pro Silberkorn in dem Standardbereich liegt, ausgenommen die Präparate, die eine massive Veränderung durch die zugegebenen Substanzen erfuhren. Damit ist eine befriedigende Reproduzierbarkeit des Meßverfahrens gewährleistet.

Die Angabe der Silberkorndichte mußte sich auf die Anzahl der Silberkörner pro Bild beschränken, da 1. Monolayerzellen bei der für Autoradiographien üblichen Hämalaunfärbung nicht deutlich abzugrenzen sind, und da 2. aufgrund der hohen Vergrößerung nur Teile mehrerer Zellen auf einer Fotographie abgebildet werden konnten. Die absolute Zellgröße war daher nicht zu ermitteln. Es liegen somit pro Gruppe 18 Einzelwerte vor.

Signifikanzberechnung

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Student-t-Test und wurde mit einer elektronischen Rechenmaschine durchgeführt.

Tabelle 2 Abhängigkeit der Partikelzahl von der Schwellwerteinstellung des QUANTIMET

Schwellwert Skt.	Silberkörner Anzahl pro Bild	Silberkörner Umfang pro Bild	Umfang pro Silberkorn
70	11	115	10,45
72	26	240	9,23
74	76	708	9,31
76	140	1490	10,64
78	209	2512	12,01
80	295	3700	12,54
82	400	5360	13,40
83	460	6290	13,67
84	510	7400	14,50
85	555	8440	15,20
86	596	9660	16,20
87	670	11150	16,64
88	735	12760	17,36
89	800	14980	18,72
90	890	17300	19,43
92	1330	25700	19,32
94	2380	46000	19,32
96	3800	83200	21,89
98	1600	116000	72,50
100	149	83000	557,04

Angabe in Bildpunkten. Bei einem mittleren Umfang von 15,7 $\pm$ 2,75 Bildpunkten pro Silberkorn (100 Einzelmessungen) liegt der reproduzierbare Meßbereich zwischen 82 und 88 Skalenteilen der Schwellwerteinstellung.

ERGEBNISSE

Kontrolle: Lichtmikroskopie

In der Kontrollfibroblastenkultur fand sich ein gleichmäßig gewachsener, voll ausgebildeter Zellrasen. Die Zellen zeigten die typischen Charakteristika von Fibroblastenzellen, wie sie auch von SÖLTZ-SZÖTS (1962) beschrieben wurden. Zwei Zelltypen waren zu sehen: spindelig geformte Zellen mit einem länglichen ovalen, stärker gefärbten Kern und größere polygonale Zellen mit entsprechend größerem Kern. Diese Kerne hatten eine mehr rundliche Form und erschienen etwas blasser. Bei beiden Zellarten war oft eine Vielzahl von kleinen, exzentrisch gelegenen, unterschiedlich großen Kernkörperchen zu finden. Das Cytoplasma erschien basophil, fein granuliert, besonders in Nähe des Kerns mit vereinzelten kleinen Vakuolen und Zelleinschlüssen. Die Plasmaausläufer der einzelnen Zellen waren häufig nicht sicher abzugrenzen, wenn die Zellen sich berührten. Einige Zellen enthielten zwei dicht aneinander liegende Kerne. Der Mitotische Koeffizient betrug 9‰. Zugrunde gehende Zellen erschienen stark blau bis violett gefärbt und abgekugelt. Oft sah man einen kleinen ovalen Kern mit zwei langen schmalen Plasmaausläufern (ähnlich dem spindeligen Zelltyp) oder nur noch rundliche, schwärzliche Flekken, die unregelmäßig begrenzt waren. Im übrigen fanden sich alle Stadien der Zellteilung.

Kontrolle: Autoradiographie

In den verschiedenen autoradiographischen Kontrollen zu den jeweiligen Substanzen waren die Silberkörner etwa gleichmäßig über die Zellen des Präparates verteilt.

Lathyrogene Substanzen

Die Werte finden sich in den folgenden Tabellen 3 und 4.

Unter dem Einfluß von 10/ug/ml D-Penicillamin konnte eine deutliche Zunahme der Zelldichte beobachtet werden, während dieser Effekt bei 1 und 100/ug/ml nur gering ausgeprägt war. Die Mitoserate ist bei allen Konzentrationen nur gering um ca. 10 % vermindert.

Bei BAPN zeigt sich ebenfalls bei der mittleren Konzentration eine deutliche Erhöhung der Zelldichte, während 1 und 100/ug/ml keinen Effekt zeigten. Die Mitotische Aktivität ist nur bei 100/ug/ml um ca. 15 % vermindert. Bei beiden Substanzen zeigten sich keine Anzeichen einer Zellschädigung, abgekugelte oder vakuolisierte Zellen konnten nicht beobachtet werden.

Die autoradiographische Bestimmung des ^{3}H-Prolineinbaus zeigte bei allen D-Penicillamindosen eine signifikante Erhöhung um etwa 60 bis 80 %. Die Schwellwerteinstellung lag hier an der oberen Grenze wegen der verstärkten Zelldichte.

Bei BAPN zeigte sich eine ähnliche Erhöhung bei 10/ug/ml, während bei 1/ug/ml eine signifikante Verminderung der Einbaurate zu finden war. 100/ug/ml BAPN zeigten keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Fettsäuren

Die Werte finden sich in den folgenden Tabellen 5 und 6.

Alle untersuchten Fettsäuren verursachten eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums, wie aus dem lichtmikroskopischen Befund hervorgeht. Gleichzeitig war die Mitoserate vermindert.

Tabelle 3 Lichtmikroskopischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Zelldichte	Mitosen	Abgekugelte Zellen
D-Penicillamin	1	130	92	--
D-Penicillamin	10	190	85	--
D-Penicillamin	100	120	92	--
BAPN	1	100	92	--
BAPN	10	150	108	--
BAPN	100	110	77	--

Bei Auszählung von 2000 Zellen pro Präparat wurden die Zelldichte als durchschnittliche Zellzahl pro Sehfeld, die Anzahl der Mitosen und die Zahl der abgekugelten Zellen bestimmt. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Kontrolle. - Während sich bei 10 µg/ml D-Penicillamin eine starke, bei 1 und 100 µg/ml eine geringere Zunahme der Zelldichte fand, führten 10 µg/ml BAPN zu einer mäßigen, 1 und 100 µg/ml zu keiner erkennbaren Zunahme der Zelldichte. Die Anzahl der Mitosen zeigte bis auf eine Abnahme bei 100 µg/ml BAPN um 23 % keine deutlichen Unterschiede zur Kontrolle. Abgekugelte Zellen waren nicht zu finden.

Tabelle 4 Autoradiographischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Anzahl der Ag-Körner pro Bild (Silberkorndichte)			mittlerer Silberkorn-umfang
		M	SD	P	
Kontrolle		345,3	± 135,0		14,61
D-Peni-cillamin	1	613,6	± 174,7	<0,01	17,59
D-Peni-cillamin	10	511,1	± 129,8	<0,01	17,45
D-Peni-cillamin	100	593,3	± 114,4	<0,01	16,13
BAPN	1	253,0	± 105,0	<0,05	14,33
BAPN	10	539,2	± 119,4	<0,01	15,35
BAPN	100	288,9	± 108,9	n.s.	14,29

M = Mittelwert (n = 18)
SD = Standardabweichung
P = Signifikanz (< 0,05 = signifikant, < 0,01 = hoch signifikant)

Es fand sich eine signifikante Zunahme der Silberkorndichte bei allen verwendeten D-Penicillaminkonzentrationen und bei 10 µg/ml BAPN, eine signifikante Verminderung bei 1 µg/ml und kein Unterschied zur Kontrolle bei 100 µg/ml BAPN.

Unter der Einwirkung von 100 und 300 µg/ml Laurinsäure ist die Zelldichte um ca. 80 % vermindert, während die Mitoserate um 20 bzw. 50 % herabgesetzt ist. Abgekugelte Zellen traten weniger als in der Kontrolle auf.

Palmitinsäure verminderte die Zelldichte in beiden Konzentrationen um ca. 60 % und die Mitoserate um 40 bzw. 80 %. Nur bei 300 µg/ml ist eine deutliche Zunahme der abgekugelten Zellen zu beobachten.

Stearinsäure hemmt bereits bei einer Konzentration von 30 µg/ml die mitotische Aktivität vollständig. Bei dieser Konzentration sind die überwiegenden Zellen abgekugelt und die Zelldichte mehr als um 50 % vermindert. Bei 100 µg/ml waren nur noch nekrotische Zellen zu sehen und bei 300 µg/ml hafteten keine Zellen mehr am Deckglas.

Bei Ölsäure war die schädigende Wirkung nicht ganz so stark ausgeprägt. Zwar hafteten bei 300 µg/ml ebenfalls keine Zellen mehr auf dem Deckglas; jedoch war bei den geringen Konzentrationen nur eine geringe Reduzierung der Zelldichte zu finden.

Bei den Autoradiographien war der ^{3}H-Prolineinbau bei allen Fettsäuren in unterschiedlichem Ausmaß vermindert.

Durch 100 µg/ml Laurinsäure fand sich eine ca. 50 %ige Verminderung der Silberkorndichte, bei 300 µg/ml um ca. 80 %.

Palmitinsäure zeigte dagegen in beiden Konzentrationen eine Herabsetzung um etwa 50 %.

Stearinsäure bewirkte bei allen Konzentrationen eine Verminderung um 60 bis 80 %.

Ölsäure führte bei 30 µg/ml zu keiner signifikanten Erniedri-

Tabelle 5 Lichtmikroskopischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Zelldichte	Mitosen	Abgekugelte Zellen
Laurinsäure	100	22	78	79
Laurinsäure	300	17	50	46
Palmitinsäure	100	37	56	115
Palmitinsäure	300	39	17	292
Stearinsäure	30	47	--	590
Stearinsäure	100	31	--	alle
Stearinsäure	300	kein Wachstum		
Ölsäure	30	88	72	110
Ölsäure	100	81	60	270
Ölsäure	300	kein Wachstum		

Bei Auszählung von 2000 Zellen pro Präparat wurden die Zelldichte als durchschnittliche Zellzahl pro Sehfeld, die Anzahl der Mitosen und die Zahl der abgekugelten Zellen bestimmt. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Kontrolle. - Bei je 300 µg/ml Stearin- und Ölsäure erfolgte kein Wachstum. In den übrigen Kulturen fand sich eine starke Abnahme der Zelldichte bei Zugabe von Laurin-, Palmitin- und Stearinsäure, eine geringere Abnahme bei Ölsäure. Alle Fettsäuren bewirkten eine starke Abnahme, Stearinsäure sogar ein totales Fehlen der Mitosen. Der Einfluß auf die Zahl der abgekugelten Zellen war unterschiedlich. Bei Laurinsäure fanden sich weniger abgekugelte Zellen als in der Kontrolle, bei Palmitin- und Ölsäure eine

mäßige, bei 30 µg/ml Stearinsäure eine stärkere Zunahme, bei 100 µg/ml Stearinsäure waren alle Zellen abgekugelt.

Tabelle 6 Autoradiographischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Anzahl der Ag-Körner pro Bild (Silberkorndichte)			mittlerer Silberkorn-umfang
		M	SD	p	
Kontrolle		628,6	± 89,9		15,99
Laurin-säure	100	344,1	± 83,7	<0,01	14,76
Laurin-säure	300	94,7	± 34,1	<0,01	16,16
Palmitin-säure	100	278,7	± 64,0	<0,01	15,69
Palmitin-säure	300	385,3	±107,1	<0,01	16,52
Kontrolle		590,3	± 76,7		16,11
Stearin-säure	30	134,9	± 68,8	<0,01	15,15
Stearin-säure	100	173,3	± 95,4	<0,01	12,89
Stearin-säure	300	96,4	± 33,2	<0,01	12,2
Ölsäure	30	594,7	± 92,1	n.s.	15,68
Ölsäure	100	326,4	± 86,6	<0,01	14,5
Ölsäure	300	46,8	± 39,3	<0,01	22,2

M = Mittelwert (n = 18); SD = Standardabweichung;
p = Signifikanz (<0,05 = signifikant, < 0,01 = hoch sign.)

Bei allen geprüften Fettsäurekonzentrationen fand sich eine hochsignifikante Verminderung der Silberkorndichte mit Ausnahme von 30 µg/ml Ölsäure. Hier war kein Unterschied zur Kontrolle festzustellen.

gung der Silberkorndichte, jedoch bei 100/ug/ml zu einer Verminderung um 40 % und bei 300/ug/ml um mehr als 90 %. Sämtliche Veränderungen waren mit $p < 0,01$ signifikant.

Proteinsynthesehemmstoffe

Die Werte finden sich in den folgenden Tabellen 7 und 8.

Unter der Puromycinwirkung nahm die Zelldichte mit steigender Konzentration ab. Die Mitosen waren um die Hälfte vermindert, während die abgekugelten Zellen bis auf das Dreieinhalbfache erhöht waren.

Urbason bewirkte bei 1/ug/ml eine Abnahme der Zelldichte um ca. 25 % bei gleichzeitiger Erhöhung der Mitosen und der abgekugelten Zellen. Bei 10/ug/ml war dagegen eine leichte Zunahme der Zelldichte, eine etwa zweieinhalbfache Erhöhung der Mitosen, jedoch eine geringere Abnahme der abgekugelten Zellen als in niedriger Dosierung zu finden.

Puromycin führte mit steigender Konzentration zu einem signifikanten Anstieg des ^{3}H-Prolineinbaus.

Bei 1/ug/ml Urbason war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle, während es bei 10/ug/ml zu einer signifikanten Hemmung der Kollagensynthese kam.

6-Aminonicotinamid

Die Werte finden sich in den folgenden Tabellen 9 und 10.

6-AN bewirkte eine Abnahme der Zelldichte um ca. 15 %. Die Anzahl der Mitosen war bei 3/ug/ml fast auf das Doppelte gestiegen und zeigte in den beiden höheren Konzentrationen

Tabelle 7 Lichtmikroskopischer Befund

Substanz	Dosierung (/ug/ml)	Zelldichte	Mitosen	Abgekugelte Zellen
Puromycin	0,01	99	40	190
Puromycin	0,1	86	50	163
Puromycin	1,0	69	50	350
Urbason	1,0	76	161	154
Urbason	10,0	112	261	80

Bei Auszählung von 2000 Zellen pro Präparat wurden die Zelldichte als durchschnittliche Zellzahl pro Sehfeld, die Anzahl der Mitosen und die Zahl der abgekugelten Zellen bestimmt. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Kontrolle.

Puromycin führte mit steigender Konzentration zu verstärkter Abnahme, Urbason bei 1/ug/ml zu einer mäßigen Abnahme, bei 10/ug/ml zu einer leichten Zunahme der Zelldichte. Die Mitosen waren unter Puromycineinwirkung erheblich vermindert, unter Urbasoneinwirkung stark erhöht. Die Zahl der abgekugelten Zellen war bei allen verwendeten Puromycinkonzentrationen und bei 1/ug/ml Urbason deutlich vermehrt, bei 10/ug/ml Urbason gering vermindert.

Tabelle 8 Autoradiographischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Anzahl der Ag-Körner pro Bild (Silberkorndichte)			mittlerer Silberkorn-umfang
		M	SD	p	
Kontrolle		590,3	± 76,7		16,11
Puromycin	0,01	671,6	± 99,3	< 0,05	14,78
Puromycin	0,1	742,8	± 40,5	< 0,01	16,26
Puromycin	1,0	881,4	±127,7	< 0,01	15,44
Kontrolle		628,6	± 89,9		15,99
Urbason	1,0	575,9	± 80,6	n.s.	15,76
Urbason	10,0	458,1	± 92,1	< 0,01	15,47

M = Mittelwert (n = 18)
SD = Standardabweichung
p = Signifikanz
(< 0,05 = signifikant
< 0,01 = hoch signifikant)

Puromycin bewirkte bei den geprüften Konzentrationen eine signifikante Zunahme der Silberkorndichte, während Urbason bei 1 µg/ml keinen Unterschied zur Kontrolle zeigte und bei 10 µg/ml zu einer signifikanten Verminderung führte.

wieder Werte wie in der Kontrolle. Es waren jedoch bei allen geprüften Konzentrationen fünf bis sieben Mal so viele Zellen abgekugelt wie in der Kontrolle.

Der ^{3}H-Prolineinbau war unter allen Konzentrationen signifikant erhöht. Dabei bestand praktisch kein Unterschied zwischen 10 und 30 µg/ml.

Tabelle 9 Lichtmikroskopischer Befund

Substanz	Dosierung (µg/ml)	Zelldichte	Mitosen	Abgekugelte Zellen
6-AN	3	86	190	530
6-AN	10	86	120	763
6-AN	30	81	100	560

Bei Auszählung von 2000 Zellen pro Präparat wurden die Zelldichte als durchschnittliche Zellzahl pro Sehfeld, die Anzahl der Mitosen und die Zahl der abgekugelten Zellen bestimmt. Alle Werte sind prozentuale Angaben der Kontrolle.

6-AN führte in allen geprüften Konzentrationen zu einer geringen Verminderung der Zelldichte, bei 3 µg/ml zu einer mäßigen, bei 10 µg/ml zu einer geringen Zunahme der Mitosen, bei 30 µg/ml war die Zahl der Mitosen wie in der Kontrolle. Die abgekugelten Zellen waren bei allen geprüften Konzentrationen erheblich erhöht.

Tabelle 10 Autoradiographischer Befund

Substanz	Dosierung (/ug/ml)	Anzahl der Ag-Körner pro Bild (Silberkorndichte)			mittlerer Silberkorn-umfang
		M	SD	p	
Kontrolle		590,3	± 76,7		16,11
6-AN	3	808,3	± 98,6	<0,01	15,64
6-AN	10	1067,4	±131,0	<0,01	18,39
6-AN	30	1063,1	±137,4	<0,01	17,96

M = Mittelwert (n = 18)
SD = Standardabweichung
p = Signifikanz
(<0,05 = signifikant;
<0,01 = hoch signifikant)

6-AN führte in allen geprüften Konzentrationen zu einer signifikanten Zunahme der Silberkorndichte.

DISKUSSION

Diese Arbeit stellt einen ersten Versuch dar, die Gewebekultur in ihrer günstigsten Form - der Monolayer-Kultur - für die quantitative Testung von Substanzwirkungen zu verwenden. Über die rein cytologisch-qualitative Methodik einer solchen Testung ist schon lange diskutiert worden. Wie aus diesen Arbeiten hervorgeht, können ohne Zweifel morphologisch-cytologische Veränderungen, wie Vakuolisierung, Schrumpfung, Abkugelung, Fortsatzbildung etc., Hinweise auf die Toxizität einer Substanz geben. Quantitative Ansätze waren aber schwierig durchzuführen, wenn sie allein auch das Aufstellen exakter Dosis-Wirkungskurven erlaubt hätten. Andererseits konnte der Parameter "Mitosehäufigkeit" im Laufe der Zeit immer häufiger als quantifizierbarer Wert ausgenutzt werden. Auch andere Werte, die Zahl der nekrotischen Zellen und die Zelldichte, erwiesen sich zur quantitativen Auswertung toxikologischer Untersuchungen in vitro als geeignet. In den hier durchgeführten Untersuchungen hat sich gezeigt, daß diese Werte tatsächlich Aussagen über cytotoxische Effekte in der Monolayer-Kultur erlauben.

Die Auswertung der Autoradiographien ergab aber so überraschende und von den bisherigen Vorstellungen abweichende Ergebnisse, daß der Versuch, diese quantitativ auswertbaren Einbaustudien zur Erfassung von Substanzwirkungen zu gebrauchen, zunächst als gescheitert angesehen werden muß. Das gilt selbst bei einem automatisierten, hoch standardisierten flächen- oder linearanalytischen Auswertesystem, wie es hier erprobt wurde.

Tatsächlich wird bei systematischer Bearbeitung dieses Themas die Fülle der methodischen Fehlermöglichkeiten erst richtig deutlich. Es beginnt mit der Zelldichte und Dicke der Cytoplasmaschicht und endet bei Problemen des Abstromes von Sub-

stanzen über das Kulturmedium sowie der Adsorption von Substanzen aus dem Medium an den Oberflächen. Natürlich können die hier trotzdem vorgestellten widersprüchlichen Resultate tatsächliche Gegebenheiten widerspiegeln, durch die besonderen Kulturverhältnisse gegenüber der in vivo-Norm verändert. Wahrscheinlicher ist aber das Vorliegen methodischer Fehler. Um diese Technik vorzustellen, ihren momentanen Stellenwert deutlich zu machen und die Diskussion hierüber anzuregen, sollen die Ergebnisse aber trotzdem offen dargelegt und der Kritik zugängig gemacht werden. Auf die Methodenkritik im einzelnen wird jetzt im folgenden eingegangen.

Die Bestimmung der Cytotoxizität der verwendeten Substanzen ist nur möglich durch Anwendung mehrerer Parameter gleichzeitig, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. Eine Verminderung der Mitosen pro 1000 Zellen kann auf eine Hemmung der Zellteilung hinweisen, kann aber ebenso gut Ausdruck einer verminderten Zellhaftung sein, so daß Zellen in der Mitose, die schon normalerweise nicht so fest haften wie die ausgebreiteten Zellen, durch leichte Bewegung des Mediums abgelöst werden können. Umgekehrt kann eine Erhöhung der Mitosezahl sowohl eine tatsächliche Erhöhung der mitotischen Aktivität sein, was Ausdruck eines aktivierten und beschleunigten Zellzyklus ist, oder aber eine Verminderung der Geschwindigkeit, mit der die Mitose abläuft. Auch abgekugelte Zellen als Ausdruck einer starken Schädigung sind natürlich nur dann zu erfassen, wenn diese Zellen noch an der Unterlage haften, was sie erfahrungsgemäß nicht mehr in abgekugeltem Zustand tun. Die Zelldichte dagegen ist Ausdruck beider Parameter: je höher die tatsächliche mitotische Aktivität, desto dichter wird der Zellrasen sein, und je mehr Zellen so geschädigt sind, daß sie sich abkugeln oder gar abschwimmen, desto dünner erscheint der Zellrasen. Durch die Kombination dieser drei Parameter erscheint also eine Aussage über die Giftigkeit einer Substanz auf die kultivierte Zelle am besten möglich.

Bei der Bestimmung des Einbaus von ^{3}H-Prolin als Ausdruck der Kollagensynthese jedoch ist zu beachten, daß hier nur die Anzahl der Silberkörner pro definiertem Areal gezählt wurde. Die Zählung selbst ist zwar mit dem Bildanalysegerät QUANTIMET 720 leicht und reproduzierbar durchzuführen, die Standardabweichung liegt jedoch teilweise mit 10 bis 30 % ziemlich hoch. Inwieweit die Silberkorndichte nun wirklich mit der Synthese von Kollagen korreliert, ist hier nicht untersucht worden. In der normalen Zellkultur ist nach Durchsicht der Literatur die Übereinstimmung gut, bei Anwesenheit von Substanzen, die die Löslichkeit des Kollagens ändern, sind Fehlermöglichkeiten vorstellbar. Durch die Anwendung von bisher bekannten Parametern, wie sie in der lichtmikroskopischen Untersuchung verwendet wurden, mit der Kombination eines neuen, noch nicht verbreiteten Auswertungsverfahrens mit einem elektronischen Bildanalysegerät ergibt sich die prinzipielle Schwierigkeit, die erhaltenen Daten mit dem Geschehen in der Zelle zu korrelieren.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, hat sich die Verwendung der Gewebekultur als Testsystem für Substanzprüfungen bewährt. Danach sind cytotoxische Effekte in Kulturen leicht nachweisbar, da sie zunächst qualitativ (z.B. Verhalten der Mitosen, cytopathogene Effekte u.a.), aber auch quantitativ durch die hier verwendeten Parameter erfaßt werden können.

Dagegen bereitet die lichtmikroskopisch quantitative Erfassung von spezifischen Stoffwechselvorgängen und deren Beeinflussung durch Pharmaka noch immer Schwierigkeiten. Andere Autoren haben deshalb meist mit biochemischen Nachweismethoden gearbeitet.

In dieser Arbeit wurde versucht, einen neuen Weg zur quantitativen Erfassung von Substanzwirkungen zu gehen. Wie diese Ergebnisse zeigen, sind mit dieser neuen Methode teilweise

verwirrende Befunde zu erhalten. Ob diese Technik eine Bereicherung der lichtmikroskopischen Auswertungsverfahren darstellt, muß noch energisch weiter geprüft werden. Es bedarf deshalb weiterer Vergleichsstudien besonders mit biochemischer Methodik, um die Aussagekraft zu erhöhen.

Lathyrogene Substanzen

D-Penicillamin hemmt die Aggregation von Kollagenvorstufen zu höheren kollagenen Strukturen, so daß der Gehalt an löslichem Kollagen zunimmt (NIMNI, 1965). Diese Wirkung wird durch Hemmung der Quervernetzungen bedingt (NIMNI et al., 1970). Bei der normalen Bildung der Quartärstruktur des Kollagens vernetzen sich die Tropokollagenfibrillen an den aus dem Lysin stammenden Aldehyden, wodurch aus löslichem Kollagen "starres" entsteht (SCHIFFMANN und MARTIN, 1970). Es wurde in in vivo-Versuchen an jungen Ratten nachgewiesen, daß D-Penicillamin die Aldehydgruppen der synthetisierten Kollagenmoleküle dosisabhängig blockiert (NIMNI et al., 1972). Diese Ergebnisse konnten indirekt durch den Ausschluß anderer Angriffspunkte bestätigt werden. So bewirkte chronische Gabe von D-Penicillamin an Ratten eine relative Erhöhung des Tropokollagens, während eine vermehrte Synthese ausgeschlossen werden konnte (RUIZ-TORRES, 1968 a). In gezielten Markierungsversuchen wurde neben der Erhöhung des Tropokollagens eine Erniedrigung des sog. Präkollagens gefunden. Gleichzeitig blieb der Aminosäureeinbau in andere, extrakollagene Eiweiße unbeeinflußt, was auf eine selektive Wirkung auf das Kollagen schließen ließ (RUIZ-TORRES, 1968 b). Weiter konnte eine Störung des Hydroxylierungsvorganges ausgeschlossen werden (RUIS-TORRES und KÜRTEN, 1973).

Das neutralsalzlösliche Kollagen, welches im Gewebe von Tieren akkumuliert, die mit D-Penicillamin behandelt wurden, unterschied sich zudem nicht vom normalen Kollagen in der Amino-

säurezusammensetzung, der optischen Drehung und der Schmelztemperatur. Es hatte jedoch eine höhere innere Viskosität, wahrscheinlich durch die Depolymerisation von zuvor unlöslichem Kollagen (DESHMUKH and NIMNI, 1969).

Die bisher erwähnten Ergebnisse wurden durch klinische Untersuchungen an sklerodermischer Lederhaut bekräftigt. Hier zeigte sich nach D-Penicillamin eine verminderte negative Kollagendoppelbrechung, die für das normale Kollagen typisch ist, eine Vermehrung der Grundsubstanz sowie eine quantitative Zunahme von dünnen Kollagenfibrillen mit einem Durchmesser von 200 bis 300 Å (normal: 800 bis 900 Å) (DARÓCZY and GYÖNGYVÉR, 1973).

Während in den Versuchen von RUIZ-TORRES und KÜRTEN (1973) bei Ratten eine Herabsetzung des Gesamthydroxyprolins nach D-Penicillamin resultierte, die auf eine indirekte Hemmung des Synthesevorgangs zurückgeführt wurde im Sinne einer Rückkopplung durch die Störung des Gleichgewichts zwischen Tropo- und Präkollagen, fanden wir in unseren in vitro-Versuchen an Fibroblastenkulturen bei allen Konzentrationen eine signifikante Erhöhung des eingebauten ^{3}H-Prolins. Dieser Effekt ist aber verbunden mit der Erhöhung der Zelldichte und angedeuteten Verminderung der Mitosenzahl. Hier muß der stark verfälschende Effekt der unterschiedlichen Zelldichte bei der Deutung unserer autoradiographischen Resultate betont werden. Eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Versuchsreihen würde nur dann bestehen, wenn die Dicke des Cytoplasmas oder noch besser die Menge der wichtigen Cytoplasmabestandteile an einem Punkt immer gleich wäre. Das kann aber nicht erwartet werden; besonders dann nicht, wenn die Zelldichte zunimmt. Hier muß eher eine starke Verdickung des Cytoplasmas pro Flächeneinheit und damit hier eine Vermehrung der Einbauaktivitäten von ^{3}H-Prolin pro Flächeneinheit vermutet werden.

Ein weiterer Einwand gegen die Relevanz dieser Befunde beruht auf dem weiteren Schicksal des Kollagens nach der Sekretion. Es wird früher oder später in größere, nicht ohne weiteres lösliche, Strukturen eingebaut. Es ist aber noch nicht bekannt, wieviel von dem niedermolekularen, leicht löslichen Kollagen nach der Sekretion in das Kulturmedium gelangt und hier dann nicht mehr nachweisbar ist. Nach lathyrogenen Substanzen müßte aber unter diesem Aspekt vermehrt Kollagen in das Medium abwandern. Andererseits ist bekannt (LANE et al., 1971), daß offenbar eine Verminderung oder Vermehrung niedermolekularen Kollagens im extrazellulären Raum über einen Rückkopplungsmechanismus zu einer Vermehrung bzw. Verminderung der Kollagensynthese oder des Prolineinbaus führt. Bei der völligen Unkenntnis über den Mechanismus der Verankerung des bereits sezernierten Kollagens im Zellverband oder dessen Lösung im Medium und darüberhinaus der Möglichkeit einer unspezifischen Adsorption des ^{3}H-Prolin bzw. seines anderweitigen Einbaus an oder in die verschiedensten Bestandteile der Monolayer-Kultur ist deshalb eine zufriedenstellende Deutung der Ergebnisse nicht möglich. Ein cytotoxischer Effekt jedenfalls ist aufgrund der cytologischen Untersuchungen sogar bei Konzentrationen bis zu 100 µg/ml auszuschließen.

ß-Aminopropionitrilfumarat (BAPN) verhindert ebenfalls die Kollagenreifung, greift jedoch einen Schritt früher als das D-Penicillamin in diesen Prozeß ein, indem es die Enzyme hemmt, die durch oxidative Desaminierung von Lysin und Hydroxylysin im Tropokollagen zur Bildung der Aldehyde führen. Das Kollagen kann also nicht vernetzen und in Fibrillen gebunden werden (BORNSTEIN, 1970; SIEGEL and MARTIN, 1970). Das BAPN bindet und inaktiviert das Enzym Lysyloxidase, welches die Umwandlung bestimmter Lysine im Kollagen und Elastin zum entsprechenden δ-Semialdehyd katalysiert. Als zweiter Mechanismus wurde die Hemmung durch Cyanoacetaldehyd beschrieben, das als Stoffwechselzwischenprodukt von BAPN entsteht und das Sub-

strat Kollagen und Elastin bindet. Dies führt zu einer zusätzlichen Blockierung der Enzymaktivität (PAGE and BENDITT, 1972). Die Aldehyde von Lysin kondensieren spontan, um verschiedene Quervernetzungen zu bilden. Die Hemmung ist irreversibel und tritt nur ein, wenn sich das Enzym aktiv am makromolekularen Substrat befindet (NARAYANAN et al., 1972). Der Effekt besteht wie beim D-Penicillamin in einer Erhöhung des löslichen Kollagens. Auch hier scheint das überschüssige Kollagen mit dem normalen identisch zu sein (LEVENE and GROSS, 1959; BORNSTEIN and PIEZ, 1966).

In unseren Versuchen wurden je nach der Konzentration unterschiedliche Wirkungen festgestellt. Bei 1/ug/ml war die Zelldichte unverändert, der ^{3}H-Prolin-Einbau gerade signifikant erniedrigt. Bei 10/ug/ml war die Zelldichte deutlich erhöht bei signifikanter Erhöhung des ^{3}H-Prolin-Einbaus. Bei 100/ug/ml war die Zelldichte leicht erhöht gegenüber der Kontrolle und die Mitosen verringert, während der ^{3}H-Prolin-Einbau unverändert blieb. Letzteres Ergebnis stimmt mit bisherigen Untersuchungen überein, nach denen die Gesamtkollagenproduktion in lathyrischen Tieren im Vergleich mit Kontrollen unverändert blieb (MARTIN et al., 1961).

Es zeigt sich hier wiederum ein unterschiedliches Ergebnis von in vivo- und diesen in vitro-Versuchen. Der bei D-Penicillamin bei allen Konzentrationen auftretende Effekt einer Erhöhung von Zelldichte und ^{3}H-Prolin-Einbau ist bei BAPN nur bei 10/ug/ml zu beobachten, während 100/ug/ml keinen und 1/ug/ml einen mit $p < 0{,}05$ gerade signifikanten Effekt zeigen, der mit den bisher publizierten in vivo-Resultaten übereinstimmt. Auch hier, wie beim D-Penicillamin, ist die Erhöhung der Silberkorndichte nach ^{3}H-Prolingaben am ehesten noch durch die Erhöhung der Zelldichte und damit der Cytoplasmadicke zu erklären (siehe vorhergehende Diskussion der D-Penicillamin-Befunde).

Der stimulierende Effekt von BAPN auf Fibroblasten in der Kultur wurde allerdings auch von anderen Autoren beschrieben. ALEO (1969) fand an 3T6-Fibroblasten eine Steigerung der Kollagenproduktion sowie eine vermehrte Glycogen- und Uronsäuresynthese (ALEO et al., 1967). In L-Zellen konnten BICKLEY und ORBISON (1964) einen Anstieg der ^{35}S-Aufnahme unter BAPN beobachten, und BURZYNSKI (1963) fand eine Erhöhung der proteingebundenen Hexosen in Fibroblasten menschlicher Gingiva. Eine zusätzlich zur Erhöhung der Zelldichte ablaufende Erhöhung der ^{3}H-Prolin-Einbaurate ist deshalb möglich.

Fettsäuren

Alle vier untersuchten Fettsäuren verursachten eine Schädigung des Zellwachstums, wie an der Abnahme der Zelldichte und der Mitoserate sowie an der Zunahme der abgekugelten Zellen zu sehen war. Die toxische Wirkung nahm mit steigender Konzentration der Fettsäuren zu.

Von mehreren Autoren wurden die freien Fettsäuren als Hemmstoffe der Atmungskette bezeichnet. In Mitochondrien von frischen Rattenlebern wurde eine Aktivierung der latenten ATPase-Aktivität gefunden, was zu einer Hemmung der Atmung in den Mitochondrien führte (PRESSMANN and LARDY, 1956; BORST et al., 1962). Als weitere Eigenschaften wurden die Inaktivierung der Succinatdehydrogenase beschrieben (EDWARDS and BALL, 1954) sowie eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme und der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien von Karottengewebe. Diese Wirkungen waren abhängig von der Konzentration. Die Phosphorylierungshemmung zeigte zusätzlich eine Abhängigkeit von der Kettenlänge der Fettsäuren, d.h., sie nahm mit steigender Kettenlänge von C_2 bis C_{12} zu. Außerdem trat eine starke Hemmung der Dehydrogenasen, die strukturell an die Mitochondrien gebunden sind (DALGARNO and BIRT, 1963), ein.

Der in den vorliegenden Versuchen verminderte ^{3}H-Prolin-Einbau ergänzt Untersuchungen, bei denen es durch freie Fettsäuren zu einer Hemmung des Aminosäureeinbaus in Mikrosomen von Meerschweinchengehirnen in vitro kam (ACS et al., 1961 u.1962).

Weiterhin liegen Ergebnisse aus Versuchen an Fibroblastenkulturen vor, bei denen ein Lipopolysacchrid aus Pseudomonas aeruginosa zu einem deutlich verminderten Kollagengehalt gegenüber der Kontrollkultur führte (RUDOLPH, 1970).

Als Angriffspunkte der Fettsäuren in der Protein- und damit auch Kollagensynthese werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. 1. Es könnte zu einer Seifenbildung durch Veresterung der Fettsäuren mit alkoholischen Gruppen der Aminosäurereste im wachsenden Protein kommen. Diese Reaktion würde aber kaum zu der ausgeprägten Störung führen, da von den häufig vorkommenden Aminosäuren nur Serin und Threonin freie OH-Gruppen besitzen und diese Säuren im Kollagen nur gering vertreten sind. 2. Die von außen zugeführten Fettsäuren werden zu den Mitochondrien und Mikrosomen transportiert und dort oxidiert oder in Lipidkomplexe überführt. Da die Proteinsynthese in den Mikrosomen lokalisiert ist, könnte hier eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Synthese eintreten. 3. Die schon beschriebene Hemmung der Sauerstoffaufnahme in Mitochondrien könnte die stark sauerstoffabhängige Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin (FLANAGAN and NICHOLS, 1962) stören, falls es hier zu einem ähnlichen Mechanismus, eventuell durch Enzymhemmung, kommt.

Nach KORFSMEIER (1969) war in menschlichen Fibroblastenkulturen eine starke ^{3}H-Palmitinsäureaktivität über dem perinukleären Cytoplasma zu messen, in dem die Golgielemente liegen, und über den Nukleolen. Er nahm an, daß hier die Fettsäuren zunächst festgehalten und in andere Lipide überführt werden. Da den Nukleoli eine Aufgabe bei der Steuerung der Proteinsynthese zugesprochen wird, wäre eine Blockierung der intranukleären

RNS denkbar. Der genaue Wirkungsmechanismus bleibt allerdings noch zu erforschen.

Proteinsynthesehemmstoffe

Puromycin. Die von BROTHERTON (1969 b) beschriebene Hemmung der DNS-Synthese in sich teilenden Zellen konnte durch unsere Versuche bestätigt werden durch zunehmende Verminderung der Zelldichte mit steigender Konzentration und einer Reduzierung der Mitosen auf die Hälfte der Kontrollkultur. Als Ausdruck der starken Zellschädigung war die Zahl der abgekugelten Zellen auf das Zwei- bis Dreifache erhöht. Im Gegensatz zu bisherigen Untersuchungen, in denen es durch Puromycin zu einer Hemmung der Proteinsynthese (NATHANS, 1964) und speziell des ^{3}H-Prolin-Einbaus in Kollagen gekommen war (JUVA and PROCKOP, 1966), fanden wir eine Erhöhung des ^{3}H-Prolin-Einbaus. Diese signifikante und dosisabhängige Erhöhung des ^{3}H-Prolin-Einbaus um 14 %, 26 % und 50 % bei 0,01; 0,1 bzw. 1,0 µg/ml Puromycin ist unerwartet. Doch ist zu beachten, daß andere Untersucher mit höheren Puromycinkonzentrationen gearbeitet haben (BROTHERTON, 1969 a; TAMAOKI and MUELLER, 1965).

Da Puromycin während seiner Aktion durch die Anlagerung an die entstehende Polypeptidkette verbraucht wird, ist vorstellbar, daß die hier verwendeten Konzentrationen nicht zur Hemmung der Proteinsynthese führen konnten. Eine weitere Erklärung für unsere Ergebnisse ist, daß mit der autoradiographischen Methode auch in der Zelle liegengebliebene unvollständige Kollagenproteinketten erfaßt werden. Auf Grund der doch massiven Steigerung des ^{3}H-Prolin-Einbaus ist jedoch die Vermutung, daß durch die extrazelluläre Verminderung des reifen Kollagens der Rückkopplungsmechanismus für die Synthese gestört ist, reine Spekulation. Wahrscheinlicher ist, daß hier verfälschende Faktoren vorhanden sind, die noch nicht bekannt und überblickbar sind.

Urbason. Über die Kortisoneinwirkung sind bisher ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse berichtet worden. Während FARNES und BARKER (1965) einen Anstieg der Zellproliferation beobachteten, fanden WIESER und TAIFOUR (1969) bei Prednisolonkonzentrationen zwischen 0,1 und 1000 µg/ml eine Wachstumshemmung, ROHDE et al. (1961) sowie RASCHE und ULMER (1968) dagegen in niedrigen Dosen eine wachstumsanregende Wirkung, bei hohen Steroidkonzentrationen jedoch eine Wachstumshemmung.

In unseren Versuchen bewirkte Urbason in den Konzentrationen von 1,0 und 10 µg/ml unterschiedliche Reaktionen des Zellwachstums. Während es bei 1,0 µg/ml Medium zu einer Abnahme der Zelldichte bei gleichzeitiger Zunahme der Mitosen und der abgekugelten Zellen kam, war die Zelldichte bei 10 µg/ml wie in der Kontrolle, die Mitosen waren stärker angestiegen. Nach der kritischen Besprechung der Parameter ist die Interpretation dieser Befunde schwierig. Die dosisabhängige Erhöhung der Mitosenzahl könnte durch eine Verlangsamung des Teilungsvorganges hervorgerufen worden sein. Allerdings ist dann nicht die der Kontrolle entsprechende Zelldichte bei 10 µg/ml Urbason zu verstehen.

Die hier gefundene Hemmung des ^{3}H-Prolin-Einbaus stimmt dagegen mit Ergebnissen anderer Autoren überein. So wurde unter dem Einfluß von Hydrocortison eine Hemmung des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren in Knorpel und Knochen gefunden (DAUGHADAY and MARIZ, 1962; VAES and NICHOLS, 1962). Dabei war sowohl die Prolin- als auch die Hydroxyprolinmenge im Kollagen erniedrigt, d.h., das Verhältnis von Prolin zu Hydroxyprolin wurde nicht verändert (NOCENTI et al., 1964).

Da in unseren Versuchen die hemmende Wirkung lediglich bei 10 µg/ml Urbason signifikant und bei 1 µg/ml die Erniedrigung nicht signifikant war, wäre es interessant, weiter zu prüfen, ob in geringeren Konzentrationen eine wachstumsfördernde Wirkung

auftritt und damit ein Wirkungsumschlag, wie er von DIRSCHERL (1953 und 1955) beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um den Übergang von einer Hemmung über normales Wachstum zur Wachstumsbeschleunigung.

6-Aminonicotinamid (6-AN)

Die Wirkung von 6-AN auf den Stoffwechsel wurde bisher, wie schon beschrieben, eingehend untersucht. Die leicht verminderte Zelldichte im Vergleich zur Kontrolle sowie die starke Zunahme der abgekugelten Zellen können als Schädigung des Zellwachstums gewertet werden. Der Anstieg der Mitosen, der mit steigender Konzentration des 6-AN jedoch wieder abnimmt, könnte seine Ursache in einer Verzögerung des Teilungsvorganges haben in einer angedeuteten Mitosearretierung; der in unseren Versuchen signifikant erhöhte ^{3}H-Prolin-Einbau läßt sich zur Zeit mit den in der vorliegenden Literatur dargestellten Ergebnissen nicht in Einklang bringen. Dieses Problem ist bereits bei der Besprechung der Wirkung der übrigen Substanzen eingehend diskutiert worden.

Da 6-AN aus den bisher bekannten Untersuchungen den Eintritt von 6-Phosphogluconat in den Pentosephosphatzyklus hemmt (HERKEN und Mitarbeiter, 1973), kommt es in Zellen ektodermalen Ursprungs zu den in der Einleitung beschriebenen charakteristischen Veränderungen, vermutlich durch den Anstau des 6-Phosphogluconats. Die hier verwendeten Zellen stammen zwar aus der Haut, sind aber als kollagenproduzierende Fibroblasten dem mesodermalen Gewebe zuzurechnen, so daß die ektodermspezifischen Effekte nicht zu erwarten waren. Möglicherweise können die Zellen mesodermalen Ursprungs die angestauten C_6-Körper weiter zur Energiegewinnung benutzen, wodurch es zu einem proportional erhöhten Ausmaß der gerade stattfindenden Synthesen kommen könnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden einige bekannte Substanzen verschiedener Stoffklassen auf ihre Wirkung in der Zellkultur geprüft. Dabei wurde die Cytotoxizität anhand der Mitosenzahl, der Zelldichte und der Zahl der abgekugelten Zellen sowie der ^{3}H-Prolin-Einbau autoradiographisch an Mäusehaut-Monolayerzellen untersucht.

1. Die lathyrogenen Substanzen D-Penicillamin und ß-Aminopropionitrilfumarat vermehren signifikant die Zahl der Silbergranula im autoradiographischen Bild nach Gaben von ^{3}H-Prolin. Eine nennenswerte cytotoxische Wirkung wurde nicht beobachtet.

2. Die Fettsäuren Laurin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäure vermindern dosisabhängig die Silberkorndichte nach ^{3}H-Prolingabe in etwas unterschiedlichem Ausmaß und wirken stark cytotoxisch.

3. Die Proteinsynthesehemmstoffe Puromycin und Urbason hemmen in geringem bis mäßigem Ausmaß das Zellwachstum. Der ^{3}H-Prolin-Einbau wird durch Urbason vermindert, während es unter Puromycineinwirkung zu einer dosisabhängigen Steigerung des ^{3}H-Prolin-Einbaus kommt.

4. Das Stoffwechselgift 6-Aminonicotinamid ist mäßig wachstumshemmend, während der ^{3}H-Prolin-Einbau stark gesteigert wird.

Die Befunde werden mit den Ergebnissen anderer Autoren verglichen und diskutiert. Es zeigen sich bei D-Penicillamin und BAPN deutliche Unterschiede zwischen der in vivo- und der in vitro-Wirkung. Die vom Wirkungsmechanismus her unerwarteten Steigerungen des ^{3}H-Prolin-Einbaus bei Puromycin und 6-AN werden diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, J. and H. Holtzer:

The loss of phenotypic traits by differentiated cells. III. The reversible behavior of chondrozytes in primary cultures.
J. Cell Biol. 28, 473-487 (1966)

Abercrombie, M. and J.E.M. Heaysman:

Invasiveness of sarcoma cells.
Nature, London, 174, 697-698 (1954)

Abraham, E.P., E. Chain, W. Baker and R. Robinson:

Penicillamine, characteristic degradation product.
Nature 151, 107 (1943)

Acs, G., A. Neidle and H. Waelsch:

Brain ribosomes and amino acid incorporation.
Biochim. Biophys. Acta 50, 403-404 (1961)

Acs, G., A. Neidle and N. Schneiderman:

The effect of fatty acids on amino acid incorporation.
Biochim. Biophys. Acta 56, 373-374 (1962)

Aleo, J.J., J.L. Orbison and W.B. Hawkins:

Histochemical and biochemical studies of strain L-fibroblast treated with a lathyrogen.
Lab. Invest. 17, 425-435 (1967)

Aleo, J.J.:

Collagen synthesis in cultured cells: The influence of Beta-Aminopropionitrile (33577).
Proc. Soc. exp. Bio. Med. 130, 451-454 (1969)

Alexander, U.:

Therapie der chronisch-aggressiven Hepatitis mit D-Penicillamin.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 77, 1303-1306 (1971)

Anastassiades, T. and D. Dziewiatkowski:

The effect of cortisone on the metabolism of connective tissues in the rat.
J. Lab. clin. Med. 75, 826-839 (1970)

Andrews, R.V.:

Temporal relationships of puromycin and ACTH effects on cultured hamster adrenal glands.
Comp. Biochem. Physiol. 30, 123-128 (1969)

Bickley, H.C. and J.L. Orbison:

The effect of a lathyrogen on sulfate metabolism in cultures of the strain L fibroblast.
Lab. Invest. 13, 172-181 (1964)

Bischoff, R. and H. Holtzer:

Mitosis and the process of differentiation of mygenic cells in vitro.
J. Cell Biol. 41, 188-200 (1969)

Bora, F.W., J.M. Lane and D.J. Prockop:

Inhibition of collagen biosynthesis as a means of controlling scar formation in tendon injury.
J. of Bone and Joint Surg 54 A, 1501-1508 (1972)

Bornstein, P. and K.A. Piez:

The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen.
Biochemistry 5, 3460-3473 (1966)

Bornstein, P.:

The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism. Is there a relation to the aging process?
Am. J. Med. 49, 429-435 (1970)

Borst, P., J.A. Loos, E.J. Christ and E.C. Slater:

Uncoupling activity of long-chain fatty acids.
Biochim. Biophys. Acta 62, 509-518 (1962)

Brock, N. and H.J. Hohorst:

Metabolism of cyclophosphamide.
Canar. 20, 900-904 (1967)

Brotherton, J.:

Uptake of amino acids into pig skin in organ culture and the effect of inhibitors of respiration, protein biosynthesis and tyrosinase.
J. Invest. Dermatol. 52, 78-88 (1969)

Brotherton, J.:

Effects of steroid hormones and of inhibitors of protein biosynthesis on thymidine and arginin incorporation by pig skin in organ culture.
Cytobios. 2, 209-220 (1969)

Burr, G.O.:

Significance of the essential fatty acids.
Federat. Proc. 1, 224-233 (1942)

Burr, G.O. and M.M. Burr:

A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from diet.
J. Biol. Chem. 82, 345-367 (1929)

Burzynski, N.J.:

Effect of beta-aminopropionitrile on cultured cells.
Lab. Invest. 12, 816-820 (1963)

Caron, G.A.:

The effect of hydrocortisone on the skin in organ cultures.
Acta Derm.-Venereol. 49, 59-63 (1969)

Chamberlain, J.G. and M.M. Nelson:

Multiple congenital abnormalities in the rat resulting from acute maternal niacin deficiency during pregnancy.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 112, 836-840 (1963)

Chamberlain, J.G.:

Early neurovascular abnormalities underlaying 6-amino-nicotinamide (6-AN)-induced congenital hydrocephalus in rats.
Teratology 3, 377-388 (1970)

Cheong, L., M.A. Rich and H.L. Eidinoff:

Mechanism of growth inhibition of M. Ep. No.1 cells by fluorodeoxycytidine and 5-fluorodeoxyuridine.
Cancer Res. 20, 1602-1607 (1960)

Coulson, W.F., A. Linker and E. Bottche:

Lathyrism in swine.
Arch. Path. 87, 411-417 (1969)

Cunningham, B. and P.L. Kirk:

Measure of "growth" in tissue culture.
J. Cell. Comp. Physiol. 20, 343-350 (1942)

Dalgarno, L. and L.M. Birt:

Free fatty acids in carrot-tissue preparations and their effect on isolated carrot mitochondria.
Biochem. J. 87, 586-596 (1963)

Danes, B.S., M.M. Broadfoot and J. Paul:

A comparative study of respiratory metabolism in cultured mammalian cell strains.
Exptl. Cell Res. 30, 369-378 (1963)

Daróczy, J. und S. Gyöngyvér:

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von D-Penicillamin (Metakaptase®) bei Sklerodermie.
Münch. med. Wschr. 115, 1363-1367 (1973)

Daughaday, W.H. and J.K. Mariz:

Conversion of proline-U-C14 to labeled hydroxyproline by rat cartilage in vitro: effect of hypophysectomy, growth hormone, and cortisol.
J. Lab. clin. Med. 59, 741-752 (1962)

Davies, L.M., J.H. Priest and R.E. Priest:

Collagen synthesis by cells synchronously replicating DNA.
Science 159, 91-93 (1968)

Davis, J.C.:

The effect of cortisol on mitosis in the skin of the mouse.
J. Path. Bact. 88, 247-252 (1964)

Dawson, M. and W.F. Dryden:

Tissue culture in the study of the effects of drugs.
J. Pharm. Sci. 56, 545-561 (1967)

Delorme, M.:

Hemmung der Insulinwirkung durch die freien Fettsäuren beim Hund.
Klin. Wschr. 43, 729-732 (1965)

Deshmukh, K. and M.E. Nimni:

A defect in the intramolecular and intermolecular cross-linking of collagen caused by penicillamine.
J. Biol. Chem. 244, 1787-1795 (1969)

Deuel, H.J., S.M. Greenberg, L. Anisfeld and D. Melnick:

The effect of fat level of the diet on general nutrition. VIII. The essential fatty acid content of margarines, shortenings, butters and cottonseed oil as determined by a new biological assay method.
J. Nutrit. 45, 535-549 (1951)

Deutsch, H.F. and J.I. Morton:

Dissociation of human serum macroglobulins.
Science 125, 600-601 (1957)

Diamond, L. and H. Koprowski:

Differential cytotoxicity in tissue culture of carcinogenic hydrocarbons dissolved in dimethyl sulfoxide.
Am. Assoc. Cancer Res. Proc. 6, 15 (1965)

Dirscherl, W. und K. Otto:

Wirkung von Steroidhormonen, besonders Desoxycorticosteron, auf die anaerobe Glycolyse von Muskelextrakten.
Biochem. Z. 324, 172-185 (1953)

Dirscherl, W.:

in: Hormone und ihre Wirkungsweise.
Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg VI,
238 S. (1955), S. 162 ff.

Dresner, E. and P. Trombly:

Chemical dissociation of the rheumatoid factor in vitro and in vivo.
Clin. Res. 8, 16 (1960)

Eagle, H.:

Metabolic studies with normal and malignant human cells in culture.
Harvey Lectures 54, 156-175 (1958-1959)

Ebner, K.E., E.C. Hageman and B.L. Larson:

Functional biochemical changes in bovine mammary cell cultures.
Exp. Cell Res. 25, 555-570 (1961)

Edwards, S.W. and E.G. Ball:

The action of phospholipase on succinate oxidase and cytochrome oxidase.
J. Biol. Chem. 209, 619-633 (1954)

Evans, V.J., J.C. Bryant, W.T. Mc Quilkin, M.C. Fioramonti, K.K. Sanford, B.B. Westfall and W.R. Earle:

Studies of nutrient media for tissue cells in vitro; protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells.
Cancer Res. 16, 77-86 (1956)

Farlane, J.E. and G.O. Henneberry:

Inhibition of the growth of an insect by fatty acids.
J. Insect. Physiol. 11, 1247-1252 (1965)

Farnes, P. and B.E. Barker:

Effect of prednisolone on human bone marrow cultures.
Metabolism 14, 75-77 (1965)

Fell, H.B.:

The influence of hydrocortisone on the metaplastic action of vitamin A on the epidermis of embryonic chick skin in organ culture.
J. Embryol. Exp. Morph. 10, 389-409 (1962)

Flanagan, B. and G. Nichols:

Metabolic studies of bone in vitro. IV. Collagen biosynthesis by surviving bone fragments in vitro.
J. Biol. Chem. 237, 3686-3692 (1962)

Foley, G.E., O.M. Friedman and B.P. Drolet:

Studies on the mechanism of action of cytoxan. I. Evidance of activation in vivo.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 111 (1960)

Gilette, R.W., D. Goulian Jr. and M. Lonway:

Comparative effects of steroids on skin maintained in organ cultures. I. Adrenal steroids.
J. Nat. Cancer Inst. 34, 643-660 (1965)

Goldberg, B., H. Green and G.J. Todaro:

Collagen formation in vitro by established mammalian cell lines.
Exp. Cell Res. 31, 444-447 (1963)

Goldberg, B. and H. Green:

An analysis of collagen secretion by established mouse fibroblast lines.
J. Cell Biol. 22, 227-258 (1964)

Golub, L., B. Stern, M. Glimcher and P. Goldhaber:

The inhibition of the maturation of newly synthesized bone collagen by ß-aminopropionitrile in tissue culture (33345).
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 129, 465-469 (1968)

Green, H. and B. Goldberg:

Kinetics of collagen synthesis by established mammalian cell lines.
Nature 200, 1097-1098 (1963)

Green, H. and B. Goldberg:

Synthesis of collagen by mammalian cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin.
Proc. Ac. Nat. Sci. 53, 1360-1365 (1965)

Greenberg, S.M., C.E. Calbert, E.E. Savage and H.J. Deuel:

The effect of fat level of the diet on general nutrition. VI. The interrelation of linoleate and linolenate in supplying the essential fatty acid requirement in the rat.
J. Nutrit. 41, 473-486 (1950)

Griffin, M.J. and R.P. Cox:

Studies on the mechanism of hormonal induction of alkaline phosphatase in human cell cultures. I. Effect of puromycin and actinomycin D.
J. Cell Biol. 29, 1-9 (1966)

Gros, H., K. Zwirner und W. Herzog:

Zur mesenchymsuppressiven Therapie der chronisch-aggressiven Hepatitis.
Med. Klin. 67, 1277-1281 (1972)

Gross, K.:

Therapeutische Beeinflussung der Bindegewebswucherung bei Lungenfibrosen durch D-Penicillamin.
Med. Klin. 67, 1034-1037 (1972)

Hall, B.K.:

Differentiation of cartilage and bone from common germinal cells. II. Inhibition of chondrogenesis induced by ß-aminopropionitrile.
Calc. Tiss. Res. 8, 276-286 (1972)

Halle, W.:

Die in vitro kultivierte Zelle als Modell für morphologische und physiologische Untersuchungen.
Gegenb. morphol. Jb. 111, 3-28 (1967/68)

Hamerman, D., G.J. Todaro and H. Green:

The production of hyaluronate by spontaneously established cell lines and viral transformed lines of fibroblastic origin.
Biochim. Biophys. Acta 101, 343-351 (1965)

Haney, A.F., E.E. Peacock jr. and J.W. Madden:

The effect of multiple lathyrogenic agents upon wound healing in rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. 142, 289-292 (1973)

Harary, J., A. Fujimoto and H. Kuramitsu:

Enzyme changes in cultured heart cells.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 13, 257-275 (1964)

Hausmann, E. and W.F. Neuman:

Conversion of proline to hydroxyproline and its incorporation into collagen.
J. Biol. Chem. 236, 149-152 (1961)

Hawtrey, A.O. and S.J. Biedron:

Release of peptide chains from rat-liver polysomes by the N,N-dimethyl-p-methyl-1-phenylalanyl-analogue of puromycin.
Nature 211, 187-188 (1966)

Herken, H.:

Die Wirkung von Antimetaboliten auf den Zellstoffwechsel des Warmblüters.
Internist 7, 375-391 (1966)

Herken, H., K. Lange and H. Kolbe:

Brain disorders induced by pharmacological blockade of the pentose phosphate pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 93-100 (1969)

Herken, H. and K. Lange:

Blocking of pentose phosphate pathway in the brain of rats by 6-aminonicotinamide.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 263, 496-499 (1969)

Herken, H., K. Keller, H. Kolbe, K. Lange und H. Schneider:

Experimentelle Myelopathie - Biochemische Grundlagen ihrer cellulären Pathogenese.
Klin. Wschr. 51, 644-657 (1973)

Hinrichsen, K. und H. von Denffer:

Zur Frage der Teilungsfähigkeit differenzierter Zellen.
Anat. Anz. 126 (Erg.-Heft), 43-47 (1970)

Hirche, H.J. und S. Koike:

Hemmung der Aufnahme und des Abbaus der Glucose im Herzmuskel narkotisierter Hunde durch die freien Fettsäuren.
Pfluegers Arch. Ges. Phys. 280, 158-164 (1964)

Holman, R.T.:

Essential fatty acids.
Nutrit. Rev. 16, 33-35 (1958)

Juva, K. and D.J. Prockop:

An effect of puromycin on the synthesis of collagen by embryonic cartilage in vitro.
J. Biol. Chem. 241, 4419-4425 (1966)

Kim, J.H., A.S. Gelbard, A.G. Perez and M.L. Eidinoff:

Effect of bromodeoxyuridine on nucleic acid and protein synthesis and viability in Hela cells.
Biochim. Biophys. Acta 134, 388-394 (1967)

Korfsmeier, K.H.:

Aufnahme und Verbleib von H^3-Palmitinsäure in menschlichen Fibroblastenkulturen. Autoradiographische Untersuchungen.
Pfluegers Arch. 305, 241-249 (1969)

Kretsinger, R.H., G. Manner, B.S. Gould and A. Rich:

Synthesis of collagen on polyribosomes.
Nature (London) 202, 438-441 (1964)

Krygier, A. und W. Sandritter:

Über die Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes von Fibroblasten in ersten Passagen der Gewebekultur.
Zschr. mikrosk. anat. Forsch. 67/3, 356-376 (1961)

Landauer, W.:

Gene and phenocopy: selection experiments and tests with 6-aminonicotinamide.
J. exp. Zool. 160, 345-354 (1965)

Lane, J.M., P. Dehm and D.J. Prockop:

The effect of proline analogue azetidine-2-carboxylic acid on collagen synthesis in vivo. I. Arrest of collagen accumulation in growing chick embryos.
Biochim. Biophys. Acta 236, 517-527 (1971)

Lange, J.:

Die Langzeitbehandlung des Morbus Wilson mit D-Penicillamin.
Dtsch. med. Wschr. 92, 1657-1662 (1967)

Lange, K., H. Kolbe, K. Keller und H. Herken:

Der Kohlenhydratstoffwechsel des Gehirns nach Blockade des Pentose-Phosphat-weges durch 6-Aminonicotinsäureamid.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 351, 1241-1252 (1970)

Lea, M.A. and G. Weber: Role of enzymes in homeostasis.

VIII. Inhibition of the activity of glycolytic enzymes by free fatty acids.
J. Biol. Chem. 243, 1096-1102 (1968)

Levene, C.J. and J. Gross:

Alterations in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by ß-aminopropionitrile (lathyrus factor).
J. Exp. Med. 110, 771-790 (1959)

Mars, R. de and K.R. Held:

The spontaneous azaguanine-resistant mutants of diploid human fibroblasts.
Humangenetik 16, 87-110 (1972)

Martin, G.R., J. Gross, K.A. Piez and M.S. Lewis:

On the intramolecular cross-linking of collagen in lathyritic rats.
Biochim. Biophys. Acta 53, 599-601 (1961)

Maxcy, R.B. and C.W. Dill:

Adsorption of free fatty acids on cells of certain micro-organism.
J. Dairy Sci. 50, 472-476 (1967)

Merchant, D.J., R.H. Kahn and W.H. Murphy:

Handbook of cell and organ culture.
Burgess publishing company, University of Michigan (1960)

Merker, H.J. und L. Novák:

Störungen der Zahnentwicklung bei Rattenembryonen nach Gaben von 6-Aminonicotinamid.
Separatum EXPERIENTIA 26, 1127 (1970)

Merker, H.J., L. Novák and B. Zimmermann:

Electron microscopic studies on the effect of 6-amino-nicotinamide on the mammalian embryos.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, 401 (1970)

Morris, C.C. and G.C. Godman:

Production of acid mucopolysaccharides by fibroblasts in cell cultures.
Nature (London) 188, 407-409 (1960)

Murray, M.R.:

Recent advances of tissue culture in cancer research.
Experientia 15, 289-294 (1959)

Narayanan, A.S., R.C. Siegel and G.R. Martin:

On the inhibition of lysyl oxidase by ß-aminopropionitrile.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 745-752 (1972)

Nathans, D.:

Inhibition of protein synthesis by puromycin.
Fed. Proc. 23, 984-989 (1964)

Nimni, M.E.:

Accumulation of a collagen in the skin of penicillamine treated rats.
Biochim. Biophys. Acta 111, 567 (1965)

Nimni, M.E. and L.A. Bavetta:

Collagen defect induced by penicillamine.
Science 150, 905 (1965)

Nimni, M.E., K. Deshmukh and A. Deshmukh:

Mechanism of inhibition of collagen cross-linking and depolymerization of an incompletely cross-linking form of insoluble collagen caused by D-Penicillamine.
Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, pp.417-430. E.A. Balazs, ed. London: Academic Press (1970)

Nimni, M.E., K. Deshmukh and N. Gerth:

Collagen defect induced by penicillamine.
Nature New Biology 240, 220-221 (1972)

Nocenti, M.R., G.E. Lederman, C.A. Furey and A.J. Lopano:

Collagen synthesis and C^{14}-labeled proline uptake and conversion to hydroxyproline in steroid-treated granulomas.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117, 215-218 (1964)

Page, R.C. and E.P. Benditt:

Diseases of connective and vascular tissues. IV. The molecular basis for lathyrism.
Lab. Invest. 26, 22-26 (1972)

Paul, J.:

Cell and tissue culture.
3rd. ed., Livingstone, Edinburgh Scotland, 304-343 (1965)

Peck, W.A., J. Brandt and J. Miller:

Hydrocortisone-induced inhibition of protein synthesis and uridine incorporation in isolated bone cells in vitro.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1599-1606 (1967)

Perlman, D., N.A. Guiffre, P.W. Jackson and F.E. Giardinello:

Effects of antibiotics of multiplication of L cells in suspension culture.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y. 102, 290-292 (1959)

Phillips, H.J. and R.V. Andrews:

Some protective solutions for tissue, cultured cells.
Exp. Cell Res. 16, 678-682 (1959)

Pomerat, C.M. and C.D. Leake:

Short term culture for drug assays: General considerations.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 1110-1128 (1954)

Ponseti, I.V.:

Lesions of the skeleton and of other mesodermal tissues in rats fed sweet pea (Lathyrus odoratus) seeds.
J. Bone Joint Surg (Am.) 36-A, 1031-1058 (1954)

Pratt, R.M. and C.T.G. King:

Inhibition of collagen cross-linking associated with ß-aminopropionitrile-induced cleft palate in the rat.
Develop. Biol. 27, 322-328 (1972)

Pressman, B.C. and H.A. Lardy:

Effect of surface active agents on the latent ATPase of mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 21, 458-466 (1956)

Priest, R.E.:

Biosynthesis of collagen and elastin. - In: Molecular pathology of connective tissues. (Ed. by R. Pérez-Tamayo and M. Rojkind) Marcel Dekker, Inc., New York, 105-134 (1973)

Puhvel, S.M. and R.M. Reisner:

Effect of fatty acids on the growth of corynebacterium acnes in vitro.
J. Invest. Derm. 54, 48-52 (1970)

Quraishi, M.S. and A.J. Thorsteinson:

Toxicity of some straight chain saturated fatty acids to house fly larvae.
J. Econ. Eutom. 58, 400-402 (1965)

Rapoport, S.M.:

Medizinische Biochemie. - VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1969)

Rasche, B. und W.T. Ulmer:

Glucocorticoidwirkung auf Wachstum und Stoffwechsel permanenter Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionsdauer.
Z. Zellforsch. 84, 506-515 (1968)

Rohde, B., H.E. Schreiner und A. Vogel:

Die Reaktion von Fibroblasten-Mischkulturen auf den Zusatz von Corticoiden und adrenocorticotropem Hormon in verschiedenen Konzentrationen.
Arzneimittelforsch. 11, 392-294 (1961)

Rohr, H.:

Die Aussagemöglichkeit der elektronenmikroskopischen Autoradiographie für eine funktionelle Cytologie. Kombinierte elektronenmikroskopisch-autoradiographische Untersuchungen mit Tritium-Prolin und Tritium-Glucose.
Schweiz. Med. Wschr. 96, 201-205 (1966)

Rojkind, M.:

Molecular structures of the fibrous components of the connective tissue. - In: Molecular pathology of connective tissue. M.Dekker, Inc. New York, 1-104 (1973).
Ed. R. Peréz-Tamayo and M. Rojkind

Rudolph, R.:

Über die Beeinflussung der Wundheilungsversorgung durch ein Lipopolysaccharid aus Pseudomonas aeruginosa.
Dissertation (1970)

Ruiz-Torres, A.:

Wirkung der chronischen Penicillaminverabfolgung auf das Kollagen.
Verh. Dtsch. Ges. f.Inn. Med. 74, 597-600 (1968)
Verlag J.E. Bergmann, München

Ruiz-Torres, A.:

Über den Mechanismus der Penicillaminwirkung auf den Kollagenstoffwechsel.
Arzneimittelforsch. 18, 594-597 (1968)

Ruiz-Torres, A. und J. Kürten:

Zur Frage der Penicillaminwirkung auf die Hydroxylierung des Prolin und Lysin.
Klin. Wschr. 51, 90-91 (1973)

Salser, J.S. and M.E. Balis:

The mechanism of action of 7-mercaptopurine. I. Biochemical effects.
Cancer Res. 25, 539-543 (1965)

Schiffmann, E. and G.R. Martin:

Spontaneous generation of cross-links in aldehyde containing collagen.
Arch. Biochem. 138, 226-232 (1970)

Schindler, R. and A.D. Welch:

Ribosidation as a means of activating 6-azaurazil as an inhibitor of cell reproduction.
Science 125, 548-549 (1957)

Schindler, R., M. Day and G.A. Fischer:

Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine in vitro.
Cancer Res. 19, 47-51 (1959)

Schneider, H. and J. Cervos-Navarro:

Acute gliopathy in spind cord and brain stem induced by 6-aminonicotinamide.
Acta neuropath. (Berl.) 27, 11-23 (1974)

Schulze, W., A. Wollenberger und W. Halle:

Feinstrukturelle und zytochemische Untersuchungen an embryonalen Hühnerherzzellen. - In: K. Lohmann (Edit.): Probleme der Zell- und Gewebezüchtung, 227 S., Verh. d. Ges. f. exp. Med. d. DDR 9, 170-171 (1966)

Schwarz, W., H.J. Merker und A. Kutzsche:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in Fibroblastenkulturen.
Z. Zellforsch. 56, 107-124 (1962)

Schwarzacher, H.G.:

Feulgen-Photometrie von Gewebekulturen.
Acta Histochem. Supp. 6, 271-274 (1965)

Schweiger, H.G.:

Proteinsynthese und Ribonucleinsäure in kernlosen Reticulozyten.
Naturwissenschaften 51, 521-533 (1964)

Siegel, R.C. and G.R. Martin:

Collagen cross-linking. Enzymatic synthesis of lysine-derived aldehydes and the production of cross-linked components.
J. Biol. Chem. 245, 1653-1658 (1970)

Smith, R.M. and S.F. Jackson:

The formation of ^{14}C-hydroxyprolin from L-^{14}C-prolin by collagen-forming cells in vitro.
Biochem. J. 64 (1956), Proc. of biochem. Soc. 8p-9p

Söltz-Szöts, J.:

Verhalten von Bindegewebszellen der menschlichen Haut in der Gewebekultur.
Arch. Klin. exp. Dermatol. 215, 202-208 (1962)

Speirs, R.S.:

Examination of the mechanism of antibody formation using nucleic acid and protein inhibitors.
Nature 207, 371-374 (1965)

Stillwell, E.F., S.P. Maroney and K.M. Wilbur:

Effect of irradiated fatty acids on the growth of Escherichia coli.
J. Bact. 77, 510-511 (1959)

Stivers, F.E., A.J. Steffek and C.T. Yarington:

The effect of lathyrogens on developing midfaciae structures in the rat.
J. Surg. Res. 11, 415-420 (1971)

Stockdale, F.E. and H. Holtzer:

DNA synthesis and myogenesis.
Exp. Cell Res. 24, 508-520 (1961)

Stockdale, F.E., J. Abbott, S. Holtzer and H. Holtzer:

The loss of phenotypic traits by differentiated cells. II. Behavior of chondrocytes and their progrency in vitro. Develop. Biol. 7, 293-302 (1963)

Stoker, M.G.P. and H. Rubin:

Density dependent inhibition of cell growth in culture. Nature 215, 171 (1967)

Swim, H.E. and R.F. Parker:

Vitamin requirements of uterine fibroblasts, strain U12-79; their replacement by related compounds. Arch. Biochem. Biophys. 78, 46-53 (1958)

Tamoki, T. and G.C. Mueller:

The effects of Actinomycin D and puromycin on the formation of ribosomes in Hela cells. Biochim. Biophys. Acta 108, 73-80 (1965)

Thompson, K.W., M.M. Vincent, F.C. Jensen and R.T. Price:

Production of hormones by human anterior pituitary cells in serial culture. Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y. 102, 403-408 (1959)

Toliver, A., E.H. Simon and P.T. Gilham:

On the mechanism of 5-bromouracil inhibition of DNA-synthesis and cell division. Exp. Cell Res. 53, 506-518 (1968)

Turbow, M.M. and J.G. Chamberlain:

Direct effects of 6-aminonicotinamide on the developing rat embryo in vitro and in vivo. Teratology 1, 103-108 (1968)

Uitto, J., P. Helin, O. Rasmussen and J. Lorenzen:

Skin collagen in patients with scleroderma: Biosynthesis and maturation in vitro, and the effect of D-Penicillamine. Ann. Clin. Res. 2, 228-234 (1970)

Vaes, G.M. and G. Nichols jr.:

Metabolism of glycine-1-C^{14} by bone in vitro: effects of hormones and other factors. Endocrinol. 70, 890-901 (1962)

Walshe, J.M.:

Wilson's disease; New oral therapy. Lancet 1, 25 (1956)

Wang, K.-H., N.R. Rose, E.A. Bartholomew, M. Balzer, K. Berde and M. Foldvary:

Changes of enzymatic activities in human diploid cell line WI-38 at various passages.
Exp. Cell Res. 61, 357-364 (1970)

Waskönig, F.W. und W. Meyer:

Zur Basistherapie der chronischen Polyarthritis mit D-Penicillamin.
Münch. med. Wschr. 45, 2047-2050 (1973)

Waymouth, C.:

Nature of the stimulus to mitosis; in: The mitotic cycle. Ed. by A. Hughes. N.Y. Acad. Press, 163 (1952)

Weinhouse, S., R.H. Millington and M.E. Volk:

Oxidation of isotopic palmitic acid in animal tissues.
J. Biol. Chem. 185, 191-200 (1950)

Weissenfels, N.:

Die Gewebezüchtung im Dienste der experimentellen Zellforschung.
Arbeitsgemeinschaft für Forsch. d. Landes Nordrhein-Westfalen 180, 43-74 (1967)

Wiepjes, G.J. and F.J.A. Prop:

Unproved method for preparation of single cell suspension from mammary glands of adult virgin mouse.
Exp. Cell Res. 61, 451-554 (1970)

Wieser, O. und A.H. Taifour:

Steroide und Fibroblastenwachstum.
Separatum Experientia 25, 841 (1969)

Young, R.W.:

Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats.
J. Cell Biol. 14, 357-370 (1962)

Zimmermann, B.K. und B.R. Balda:

Untersuchungen über die Löslichkeit von Hautkollagen bei Sklerodermie und den Effekt von D-Penicillamin.
Arch. Derm. Forsch. 243, 357-363 (1972)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H.-J. Merker, für die Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referates meinen besonderen Dank aussprechen.

Fräulein Heidi Wohlfeil danke ich für die Herstellung der Autoradiographien.

Herrn Bernd Zimmermann danke ich vielmals für die Herstellung der Fibroblasten-Kulturen sowie für seine umfangreiche Hilfe und Beratung bei der Erarbeitung des elektronischen Auswertungsverfahrens.

LEBENSLAUF

Judith Einhorn geb. Meyer, geboren am 1.5.48 in Bremen als Tochter des Bundesbahnbetriebswartes Erich Meyer und seiner Ehefrau Charlotte geb. Pellischek-Wilsdorf.

Schulbesuch ab 1955 in Bremen. Reifeprüfung 1967 auf dem neusprachlichen Zweig des Gymnasiums am Leibnizplatz.

Medizinstudium ab Wintersemester 1967/68 in Bonn, Mainz, Hamburg und Berlin. Am 26.8. 74 Ärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin. Medizinalassistentenzeit auf der I. Chirurgischen Abteilung, der I. Inneren Abteilung und am Pathologischen Institut des Städtischen Krankenhauses Am Urban sowie beim Sozialpsychiatrischen Dienst im Gesundheitsamt Berlin-Charlottenburg.

Nach der Bestallung als Ärztin seit Januar 1976 wissenschaftliche Assistentin an der Augenklinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin, Klinikum Westend.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198